



N° ordre : 2011-9
N° Série : B-213

THESE

Présentée devant AGROCAMPUS OUEST
Sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne

Pour obtenir le diplôme de :
Docteur de l'Institut Supérieur des Sciences
Agronomiques, Agro-alimentaires, Horticoles et du Paysage
Spécialité : « physico-chimie et qualité des bioproduits »
Ecole doctorale : « Vie Agronomie Santé »

présentée par :
SALVATORE Delphine

Interactions à l'échelle moléculaire et mécanismes d'assemblage de deux protéines alimentaires : l' α -lactalbumine et le lysozyme.

Préparée
au CEA Grenoble, UMR5249 Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux
17, rue des Martyrs – 38000 Grenoble
&
à l'INRA-Agrocampus, UMR1253 Science et Technologie du Lait et de l'œuf
65, rue de Saint-Brieuc – 35000 Rennes

Soutenue le 11 Avril 2011 devant la commission d'Examen

Composition du Jury :

Mme. F. Nau, Professeur, Agrocampus Ouest
M. A. Matagne, Professeur, Université de Liège
M. C. Sanchez, Professeur, Université de Montpellier 2
M. R. Guérois, Chercheur CEA, CEA Saclay
M. A. Bondon, Directeur de Recherche CNRS, Université de Rennes 1
M. S. Bouhallab, Directeur de Recherche INRA, INRA Rennes
M. V. Forge, Chercheur CEA, CEA Grenoble

Présidente
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directeur de thèse
Co-Directeur de thèse



*A mon étoile
et à tous mes proches,*

Remerciements

Je remercie sincèrement mes encadrants qui se sont montrés très pédagogues et toujours disponibles pour répondre à mes multiples questions. Je leur suis très reconnaissante d'avoir partagé avec moi leurs connaissances respectives et leur Expérience, « avec un grand E », de la recherche. J'ai beaucoup évolué durant ces trois dernières années ; leur tâche d'encadrant est sans aucun doute accomplie et avec brio !! Je remercie Vincent, plus particulièrement pour sa patience car, comme il l'a souvent dit : « ça n'a pas été tous les jours facile » !!! Mais bon, j'étais quand même là pour faire le café ! Et Saïd pour sa curiosité permanente quant à l'avancée de mes travaux ; il est toujours resté à l'écoute et bienveillant à ce que tout se passe pour le mieux. Il a même contribué à mon développement au baby-foot, bien que ce ne soit pas toujours évident avec les débutants ! Je tiens également à souligner l'ambiance de travail qui fut très agréable compte tenu de leur sympathie et de leur agréable sens de l'humour !

Je remercie également Adrien qui m'a accompagnée lors de ma découverte du monde complexe de la résonance magnétique nucléaire ! Sa disponibilité et sa bonne humeur ont très certainement adouci cette étape d'apprentissage. Je remercie Nicolas pour son tutorial pour utiliser LINUX et les logiciels destinés au traitement de données qui m'ont permis de réaliser l'interminable « peak picking ». Merci également à Catherine Bougault que j'ai rencontrée au début de ma thèse aux Houches ; c'est dans ce cadre idyllique que j'ai abordé la RMN en douceur grâce à ces qualités indéniables d'enseignante. Dans le cadre de mon comité de thèse, elle a également activement participé aux réflexions qui ont fait naître l'idée d'étudier les hétérodimères ; donc un grand merci car sans elle une grande partie de ma thèse, et certainement la plus intéressante, n'aurait pas connu le jour !

Je remercie sincèrement Taco pour son enthousiasme pour mon projet et sa dévotion à tirer le maximum d'informations de mes deux semaines de manip passées au Mans. Ce fut intense mais également très enrichissant et plaisant. J'aurai beaucoup appris en très peu de temps ! L'occasion aussi pour moi de travailler à nouveau avec nos chers voisins hollandais, alors Dank U Wel !!

Thanks also to Björn & Mikael for their efficient work on molecular simulations and to Roberts & Harald for their gift, i.e. some ^{15}N -Lysozyme perfectly folded! Our collaboration ended in a great job and I am sincerely grateful to all of you.

Un grand merci à Sylvie et Stéphanie qui ont apporté leur expertise au projet ANR, respectivement pour l'étude des propriétés interfaciales des microsphères et pour leur

stabilité lors du procédé de lyophilisation. Je remercie également Véronique pour sa participation à mon comité de thèse et m'excuse d'avoir eu à remettre en questions les résultats précédemment obtenus par anisotropie ! Elles furent toutes les trois des partenaires actifs avec qui ce fut très agréable de collaborer. Parmi les membres du STLO, je remercie Marie-Madeleine qui dès le début de ma thèse m'a accueillie très chaleureusement et m'a permis de prendre connaissance avec mes deux protéines grâce aux outils de visualisation moléculaire☺, Thomas et Stéphane qui ont également été très enthousiastes concernant mon travail. Un grand merci également à tous les doctorants que j'ai rencontrés à Rennes, plus particulièrement, Marieke et Lila grâce à qui mes passages au STLO ont été très agréables.

Je souhaite remercier du fond du cœur, ma p'tite Peg' qui m'a accueillie les bras ouverts à Grenoble, Flo et Julien avec qui j'ai partagé cette grande expérience BIOTechno et Mam'zelle Mathevon qui a toujours été présente pour me filer des « petits » coups de pouce indispensables (malheureusement trop tard pour la purif de prot...). Je leur suis très reconnaissante pour leur écoute amicale et leur disponibilité, car j'ai toujours pu compter sur leur aide. Je n'oublierai jamais les superbes moments que nous avons partagés ; nos sorties en montagne ainsi que tous nos petits repas ont été comme des souffles d'air frais d'une grande utilité pour mon travail. Je remercie également Christelle(!) et Christophe, mes deux collègues de bureau, pour leur soutien et leur bonne humeur☺. Merci aussi à Babeth pour sa sympathie et son aide pour le café ;), à Greg pour ...euh..., ah si, tous les moments de franche rigolade ! et à Charline, Fatima, Laure, Alexis et Fabien pour leur énergie ; des stagiaires très sympathiques qui sont comme des p'tits rayons de soleil au labo ! En résumé, merci à tous ces chers membres du LCBM; ce fut chaque jour un réel plaisir de venir au labo grâce à vous !

Je tiens également à remercier toute ma famille, qui malgré la distance a toujours été présente et d'un grand soutien dans les moments de doutes. Nous avons traversé de durs moments et j'en profite pour les féliciter de leur courage. Je ne les remercierai jamais assez car ils m'ont transmis la force nécessaire pour toujours aller de l'avant et car sans eux je ne serai pas docteur aujourd'hui !

Enfin, un ENORME merci à Guillaume qui a sans doute été le plus patient et le plus réconfortant et qui, comme toutes ces personnes, a toujours cru en moi et a su me le rappeler quand il le fallait. Son soutien m'a non seulement permis de réaliser cette thèse mais également de préparer la suite sereinement et c'est avec beaucoup d'impatience que je me réjouis de commencer ce nouveau chapitre à ses côtés !

Valorisation du travail de thèse

1. *Publications*

D. Salvatore, T. Croguennec, S. Bouhallab, V. Forge & T. Nicolai. *Kinetics and structure during self-assembly of oppositely charged proteins in aqueous solution*. **Biomacromolecules** – en cours de publication

D. Salvatore, N. Duraffourg, A. Favier, B. Persson, M. Lund, M-M. Delage, R. Silvers, H. Schwalbe, T. Croguennec, S. Bouhallab & V. Forge. *Investigation at residue level of the early steps during the assembly of two proteins into supramolecular objects*. **Biomacromolecules** – en cours de publication

2. *Communication orale*

D. Salvatore, N. Duraffourg, A. Favier, B. Persson, M. Lund, M-M. Delage, R. Silvers, H. Schwalbe, T. Croguennec, S. Bouhallab & V. Forge. **(2010)** *Interacting surfaces in α -lactalbumin-lysozyme Heterodimers*. **Réunion annuelle des utilisateurs du TGIR-RMN**, 8 Novembre, Lyon, France.

3. *Communications écrites (posters)*

D. Salvatore, N. Duraffourg, T. Croguennec, S. Bouhallab & V. Forge. **(2009)** *Micro-spheres of Apo α -Lactalbumin and Lysozyme: Interactions at amino acid level and mechanism of assembly*. **4th IDF Dairy Science and Technology Week**, 20-23 Avril, Rennes, France.

D. Salvatore, N. Duraffourg, T. Croguennec, S. Bouhallab & V. Forge. **(2009)** *Micro-spheres of Apo α -Lactalbumin and Lysozyme: Interactions at amino acid level and mechanism of assembly*. **3rd International Symposium: Delivery of functionality in complex food systems**, 18-21 Octobre, Wageningen, Netherlands.

D. Salvatore, N. Duraffourg, A. Favier, R. Silvers, H. Schwalbe, T. Croguennec, S. Bouhallab & V. Forge. **(2010)** *α -Lactalbumin – Lysozyme heterodimers : interacting surfaces at residue level*. **24th Conference of the European Colloid and Interface Society**, 5-11 Septembre, Prague, Czech Republic.

Abréviations

apoLAC	Apo α -lactalbumine (forme décalcifiée)
ATR	Attenuated Total Reflection (spectroscopie infrarouge en mode réflexion)
BMRB	Biological Magnetic Resonance Bank
CLSM	microscopie confocale à balayage laser
D	Coefficient de diffusion ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)
D_e	distance d'écrantage de Debye (m)
dI_n/dt	Vitesse de croissance des particules ($\text{L} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)
DO	Densité optique
D_2O	Eau deutérée
$\Delta\delta$	Variation de déplacement chimique combiné (ppm)
$\Delta\delta_{\text{max}}$	Variation de déplacement chimique combiné à saturation (ppm)
$\Delta\delta_N$	Variation de déplacement chimique dans la dimension azote (ppm)
$\Delta\delta_H$	Variation de déplacement chimique dans la dimension proton (ppm)
ΔG	Variation d'énergie libre du système ($\text{J} \cdot \text{mol}^{-1}$)
ΔH	Variation d'enthalpie du système ($\text{J} \cdot \text{mol}^{-1}$)
ΔS	Variation d'entropie du système ($\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$)
ΔS_{conf}	Variation d'entropie conformationnelle ($\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$)
ΔS_{sol}	Variation d'entropie de solvation ($\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$)
$\Delta S_{t/r}$	Variation d'entropie translationnelle/rotationnelle ($\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$)
$\partial n / \partial c$	Incrément d'indice de réfraction ($\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$)
ε	Coefficient d'extinction molaire ($\text{L} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)
ε_0	constante diélectrique du vide ($8.85 \cdot 10^{-12} \text{ A} \cdot \text{s} \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{m}^{-1}$)
ε_r	constante diélectrique du milieu ($\text{A} \cdot \text{s} \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{m}^{-1}$)
facteur A	Rapport des intensités de fluorescence émises à 320 et 350 nm: $I_{320\text{nm}}/I_{350\text{nm}}$
FTIR	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
$g_2(t)$	Fonction d'autocorrélation de l'intensité diffusée
γ	rapport gyromagnétique ($\text{rad} \cdot \text{T}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)
holoLAC	Holo α -lactalbumine (forme calcifiée)
I (ou C_{salt})	Force ionique du milieu ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
$I(q)$	Intensité de lumière diffusée
$I_n(q)$	Intensité de lumière diffusée normalisée à la concentration en protéine ($\text{L} \cdot \text{g}^{-1}$)

K (ou H)	Constante optique du système (L.mol.g^{-2})
Ka	Constante d'association (mM^{-1})
Kd	Constante de dissociation (mM)
k	constante de Boltzmann ($1.38 \cdot 10^{-23} \text{ m}^2.\text{kg.s}^{-2}.\text{K}^{-1}$)
l	Chemin optique (cm)
LAC ou α -LA	α -lactalbumine
LYS	Lysozyme
λ	Longueur d'onde (nm)
M_w	Masse molaire (g.mol^{-1})
Na	Nombre d'Avogadro ($6.02 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$)
n_s	indice de réfraction du milieu
n_{tol}	indice de réfraction du toluène
η	viscosité de la solution ($\text{kg.m}^{-1}.\text{s}^{-1}$)
pdb	protein data base
pD	potentiel Deutérium
pI	point Isoélectrique
P(q)	Facteur de forme des particules
q	Vecteur d'onde (m^{-1})
Q	Charge électrique (A.s)
r	distance entre atomes (\AA)
R	Constante des gaz parfaits ($8.31 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$)
R_g	Rayon de giration (nm)
R_h	Rayon hydrodynamique (nm)
RMN	Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire
R_{tol}	Ratio de Rayleigh constant du toluène (cm^{-1})
Γ	Taux de relaxation (s^{-1})
S(q)	Facteur de structure de la suspension
T	température (K)
θ	angle de détection ($^\circ$)
τ	Turbidité de la solution (cm^{-1})
^{15}N -protéine	Protéine recombinante uniformément marquée à l'azote 15
^1H - ^{15}N HMQC	Spectre de corrélation ^1H , ^{15}N (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence)

Sommaire

Remerciements	5
Valorisation du travail de thèse	7
1. <i>Publications</i>	7
2. <i>Communication orale</i>	7
3. <i>Communications écrites (posters)</i>	7
Abréviations	9
Sommaire	11
Introduction Générale.....	15
I. Etude bibliographique	21
1. Les protéines globulaires.....	22
1.1. Niveaux de structurations.....	22
1.1.1. Structure primaire.....	22
1.1.2. Structure secondaire	23
1.1.3. Structure tertiaire.....	25
1.1.4. Structure quaternaire	27
1.2. Repliement et intermédiaires partiellement repliés	28
2. Les interactions protéine-protéine	32
2.1. Stabilité et solubilité d'une protéine globulaire	32
2.2. Forces régissant les interactions protéine-protéine	34
2.3. Paramètres thermodynamiques des interactions protéine-protéine	36
2.4. Prédiction des interactions protéine-protéine	37
2.4.1. Analyse structurale des interfaces protéine –protéine.....	38
2.4.2. Prédiction par simulations moléculaires	40
3. Des interactions protéine-protéine à l'assemblage en objets supramoléculaires	46
3.1. Agrégation vs assemblage	46
3.2. Assemblages protéiques en biologie	47
3.2.1. Le virus de la mosaïque du tabac	48
3.2.2. Les microtubules	49
3.2.3. Le collagène	50
3.2.4. Les fibres amyloïdes.....	51
3.3. Auto-assemblage pour le développement de nouveaux biomatériaux	53
3.3.1. Systèmes mono-protéiques.....	55
3.3.1.1 Assemblages linéaires	55
3.3.1.2 Assemblages sphériques.....	59
3.3.1.3 Les hydrogels	63
3.3.2. Systèmes binaires	65
3.3.2.1 Protéine-polysaccharide	65
3.3.2.2 Systèmes à deux protéines.....	66
3.3.3. Applications potentielles des assemblages protéiques	69
4. Système d'étude	74
4.1. L' α -lactalbumine et le lysozyme	74
4.1.1. Origines	74

4.1.2.	Fonctions biologiques	75
4.1.3.	Structures tridimensionnelles	76
4.1.4.	Stabilité et propriétés physico-chimiques.....	77
4.2.	Interactions et assemblages de l' α -lactalbumine et du lysozyme.....	79
4.3.	Etude à l'échelle moléculaire et mécanisme d'assemblage.....	83
II.	Matériels et Méthodes	87
1.	Matériels d'étude	88
1.1.	Purification des protéines naturelles	88
1.2.	Production et purification de protéines recombinantes	88
1.3.	Préparation des solutions protéiques	95
2.	Méthodes	96
2.1.	Obtention des microsphères et quantification de la proportion de protéines assemblées	96
2.2.	Turbidité des solutions	96
2.3.	Microscopie optique	97
2.4.	Microscopie confocale à balayage laser (CLSM)	97
2.5.	Fluorescence intrinsèque	98
2.6.	Dichroïsme circulaire	99
2.6.1.	Principe.....	99
2.6.2.	Mode opératoire	100
2.7.	Spectroscopie Infrarouge.....	101
2.7.1.	Principe.....	101
2.7.2.	Montage expérimental.....	103
2.7.3.	Mode opératoire	104
2.8.	Perturbations de déplacements chimiques par 2D-RMN	106
2.8.1.	Principe.....	106
2.8.2.	Mode opératoire	108
2.8.3.	Traitement des données	110
2.8.3.1	Attribution des spectres	110
2.8.3.2	Calcul du déplacement chimique combiné ($\Delta\delta$)	112
2.8.3.3	Détermination de la constante de dissociation (K_d) et du déplacement chimique à saturation ($\Delta\delta_{\max}$).....	112
2.8.3.4	Intensité totale des spectres	114
2.9.	Cinétiques d'échange hydrogène/deutérium	115
2.10.	Diffusion de lumière.....	119
2.10.1.	Diffusion statique de la lumière	119
2.10.2.	Diffusion dynamique de la lumière	122
2.10.3.	Montage expérimental.....	125
2.10.4.	Modes opératoires	125
2.10.4.1	Mesures mutli-angles	126
2.10.4.2	Cinétiques.....	127
III.	Résultats	129
1.	Chapitre1 : Caractérisation moléculaire des interactions à l'échelle des hétérodimères	130
1.1.	Méthode du « Chemical Shift Mapping » par RMN bidimensionnelle	131
1.2.	Résumé détaillé de l'article 1	135
1.3.	Article 1	138
1.4.	Structure tridimensionnelle du dimère holoLAC-LYS	167

1.5.	Accessibilité et nature des acides aminés impliqués dans les interactions	168
1.5.1.	Accessibilité des acides aminés actifs	168
1.5.2.	Nature des acides aminés actifs accessibles	169
1.6.	Identification des acides aminés de l'apo α -lactalbumine impliqués dans les interactions avec le lysozyme à 20°C.....	172
1.7.	Conclusions du Chapitre 1 et perspectives.....	177
2.	Caractérisation des interactions à l'échelle moléculaire au sein des microsphères	179
2.1.	Approches expérimentales pour l'étude des interactions au sein des microsphères.....	180
2.1.1.	Quantification des changements de structure secondaire par spectroscopie infrarouge	180
2.1.2.	Etude des interactions protéine-protéine par la méthode des échanges hydrogène/deutérium.....	181
2.2.	Les cinétiques d'échange hydrogène/deutérium	182
2.2.1.	Initiation des échanges hydrogène/deutérium	182
2.2.2.	Arrêt des échanges et déstabilisation des microsphères.....	185
2.2.3.	Estimation de la vitesse d'échange.....	187
2.3.	Quantification des changements de structure secondaire.....	191
2.3.1.	Formation de microsphères dans un tampon deutéré	191
2.3.2.	Influence de la température et de la force ionique sur les structures secondaire et tertiaire de l'apo α -lactalbumine	193
2.3.3.	Structure secondaire des protéines assemblées en microsphères	196
2.4.	Conclusions du Chapitre 2 et perspectives.....	199
3.	Cinétiques et mécanismes d'assemblage.....	203
3.1.	Caractérisation des assemblages protéiques par diffusion de lumière	204
3.2.	Intensité de la lumière diffusée en fonction des conditions physico-chimiques	206
3.2.1.	Dépendances angulaires en fonction de la température d'incubation	206
3.2.2.	Dépendances angulaires en fonction de la concentration.....	208
3.2.3.	Stabilité des échantillons après dilution	210
3.2.4.	Dépendances angulaires en fonction de la force ionique	213
3.3.	Résumé détaillé de l'article 2	215
3.4.	Article 2.....	217
3.5.	Conclusions du Chapitre 3 et perspectives.....	224
IV.	Discussion générale	227
1.	Interactions gouvernant la formation des unités élémentaires	228
2.	Des tétramères à la formation de particules sub-micrométriques	229
3.	Interactions impliquées dans la formation et la stabilité des objets supramoléculaires	231
4.	Stabilité des microsphères	232
V.	Conclusions & Perspectives d'applications.....	235
	Références bibliographiques	243
Annexe 1: Les acides aminés		
Annexe 2: Attributions des spectres RMN (I=39mM, pH 7.5, 45°C)		

Introduction Générale

Les interactions protéine-protéine sont impliquées dans de nombreux processus biologiques. En effet, la régulation des voies métaboliques, les réponses immunitaires ou encore la régulation du cycle cellulaire mettent en jeu des complexes protéiques. Les assemblages protéiques peuvent être fonctionnels et participer à l'intégrité cellulaire, tels que les microtubules et les filaments d'actine du cytosquelette, ou causer des dysfonctionnements cellulaires, tels que les dépôts amyloïdes résultant de l'agrégation non contrôlée de protéines mal repliées, qui sont impliqués dans des pathologies telles que la maladie d'Alzheimer.

L'ensemble des études fondamentales réalisées dans le but de comprendre la spécificité de ces interactions, leur stabilité, leur réversibilité et le mécanisme par lequel les protéines s'auto-assemblent a amené de nombreuses équipes de recherche à s'inspirer de ce phénomène naturel pour le développement de biomatériaux.

En modulant les paramètres physico-chimiques, les propriétés d'auto-assemblage des biopolymères peuvent être contrôlées pour obtenir des objets de morphologies variées présentant des propriétés fonctionnelles intéressantes. Celles-ci confèrent à ces objets un large potentiel d'applications convoité par les industries agroalimentaires, pharmaceutiques et biotechnologiques. Un intérêt plus particulier est porté à l'utilisation de polymères naturels tels que les protéines, les lipides et les polysaccharides du fait de leur biocompatibilité et biodégradabilité ainsi que de la valorisation de coproduits issus de la transformation des produits agricoles. Cependant un prérequis à l'utilisation des objets résultant de leur assemblage est la compréhension des forces gouvernant leur formation et leur stabilité afin de les fabriquer d'une manière contrôlée et de maîtriser leur fonctionnalité.

C'est dans ce contexte que s'inscrit mon projet de thèse, en s'intéressant plus particulièrement aux objets supramoléculaires formés par interaction et assemblage de deux protéines alimentaires : l' α -lactalbumine, issue du lactosérum de lait et le lysozyme, issu du blanc d'oeuf de poule. Des travaux précédents ma thèse, réalisés à l'INRA de Rennes (UMR STLO) ont mis en évidence des propriétés intéressantes en étudiant ce système binaire. Alors que la forme calcifiée de l' α -lactalbumine (holo α -lactalbumine) interagit avec le lysozyme pour former des hétérodimères, l'assemblage des protéines en objets supramoléculaires (plusieurs microns) n'est observé que lorsque le lysozyme interagit avec la forme décalcifiée de α -lactalbumine, l'apo α -lactalbumine. La formation de ces objets est principalement

gouvernée par des interactions électrostatiques puisqu'ils sont obtenus dans une gamme de pH étroite, où les deux protéines portent des charges de signe opposé, et qu'une augmentation de la force ionique du milieu est défavorable à leur formation du fait de l'écrantage des charges complémentaires. D'autres forces de faible énergie, telles que des associations hydrophobes et des liaisons hydrogènes semblent également être impliquées dans la stabilité des objets formés. La particularité de ce système est l'obtention d'objets supramoléculaires dont la morphologie dépend de la température appliquée : des agrégats amorphes sont obtenus à température ambiante ou inférieure, alors que des objets ordonnés de forme sphérique, appelés microsphères, sont obtenus par incubation des protéines à 45°C. A cette température, le lysozyme est dans sa conformation native alors que l'apo α -lactalbumine adopte une conformation particulière, appelée globule fondu ou « molten globule ». Cet état est caractérisé par des structures secondaires natives et l'absence de structure tertiaire stable, ce qui lui confère une flexibilité particulière. Il semble donc que la formation de microsphères soit gouvernée par des interactions spécifiques résultant d'informations contenues à l'échelle moléculaire.

Dans le but de comprendre comment ces informations contenues à l'échelle moléculaire se propagent à l'échelle macroscopique, les objectifs de mon projet de thèse sont de caractériser les interactions spécifiques entre l'apo α -lactalbumine et le lysozyme à l'échelle moléculaire et d'établir leur mécanisme d'assemblage. Ces travaux visent d'une part à apporter des éléments fondamentaux pour la compréhension de systèmes protéiques binaires et d'autre part à maîtriser davantage la formation de ces objets supramoléculaires pour envisager leur application potentielle, telle que la vectorisation de principes actifs.

Mon projet de thèse s'inscrit dans un projet financé par l'ANR regroupant les compétences de quatre laboratoires pour caractériser ces objets supramoléculaires. L'influence des paramètres physico-chimiques sur les objets formés était principalement étudiée à l'INRA de Rennes, la stabilité des microsphères lors du processus de lyophilisation a été étudiée à l'INRA de Paris-Grignon et les propriétés rhéologiques de ces objets ont été étudiées à l'Institut de Physique de Rennes. Afin de caractériser les interactions à l'échelle moléculaire, une collaboration a également été établie avec le Laboratoire de Chimie et de Biologie des Métaux du CEA de Grenoble offrant une expertise incontestable dans le domaine de la biophysique. La majorité de mes travaux ont été réalisés à Grenoble et a

consisté en l'étude du système α -lactalbumine-lysozyme à différentes échelles en utilisant diverses techniques de biophysiques apportant des informations complémentaires.

Les travaux réalisés cherchent à répondre aux questions suivantes : Pourquoi seuls les hétérodimères composés de lysozyme et de la forme décalcifiée de l' α -lactalbumine sont-ils capables de s'assembler en objets supramoléculaires ? Par quel mécanisme les protéines en solution s'assemblent-elles en agrégats amorphes ou en microsphères ? L'assemblage nécessite-t-il des changements structuraux des protéines ? A quel niveau la température et l'état conformationnel de l'apo α -lactalbumine jouent-ils un rôle pour l'apparence d'ordre dans les objets supramoléculaires ?

La synthèse bibliographique présentée dans une première partie, rappelle les niveaux de structuration des protéines globulaires ainsi que des éléments généraux de la réaction de repliement, avant de s'intéresser aux propriétés physico-chimiques des protéines globulaires, aux forces gouvernant les interactions protéine-protéine et à l'aspect thermodynamique de celles-ci. Les outils informatiques utilisés pour prédire et comprendre la formation de complexes protéiques seront également présentés. Une troisième partie est ensuite consacrée aux assemblages protéiques en biologie et à l'utilisation des propriétés d'auto-assemblage des protéines pour le développement de biomatériaux. Des exemples variés d'objets supramoléculaires résultant de l'assemblage d'une même protéine ou de systèmes impliquant plusieurs partenaires seront présentés afin de souligner l'influence des paramètres physico-chimiques sur la morphologie et la stabilité des objets formés. L'utilisation de ceux-ci sera illustrée par la présentation de diverses applications. Une dernière partie est dédiée au système d'étude, incluant une description des deux protéines ainsi qu'une présentation détaillée des travaux réalisés précédemment, suivie de la stratégie expérimentale adoptée pour caractériser les interactions à l'échelle moléculaire et établir le mécanisme d'assemblage.

Après la description des principaux matériels et méthodes mis en œuvre dans ce travail, les principaux résultats sont exposés en trois chapitres (Figure 1).

Le chapitre 1 est consacré à la caractérisation structurale des hétérodimères holo α -lactalbumine-lysozyme et apo α -lactalbumine-lysozyme. Les acides aminés des protéines composant leur interface ont été identifiés par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire bidimensionnelle (RMN 2D). Ces travaux expérimentaux ont été complétés par une approche de modélisation moléculaire.

Le second chapitre présente les travaux réalisés pour étudier les interactions au sein des microsphères. L'arrangement des protéines et les interactions impliquées dans ces objets ont été étudiés par spectroscopie infrarouge afin de quantifier les éventuels changements de structure secondaire des protéines assemblées. Nous avons également tenté d'appliquer la méthode des échanges hydrogène/deutérium à notre système.

Enfin, le chapitre 3 concerne l'étude du mécanisme d'assemblage à l'échelle sub-micrométrique. La croissance des particules, des hétérodimères à la formation d'objets supramoléculaires, a été caractérisée par diffusion de lumière en réalisant des cinétiques d'assemblage en fonction des conditions physico-chimiques du milieu.

A la fin de chaque chapitre, les principaux résultats seront résumés pour répondre aux questions posées et des perspectives expérimentales seront proposées.

La dernière partie de ce mémoire est dédiée à la synthèse des résultats obtenus aux différentes échelles sous la forme d'une discussion générale. Ce manuscrit se termine par une conclusion générale où des applications potentielles seront proposées, suivie de la liste des références bibliographiques.

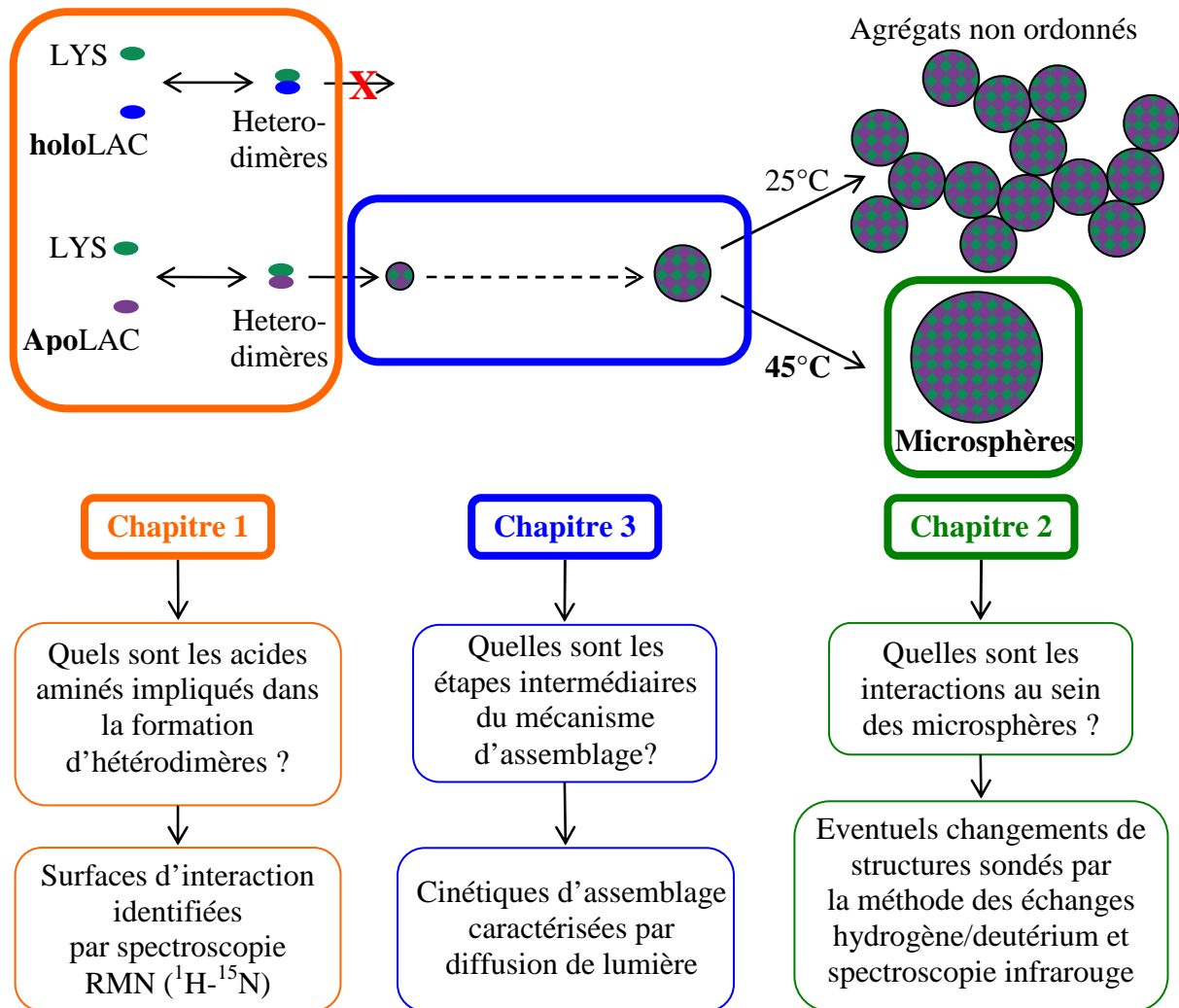


Figure 1 : Organisation du manuscrit selon la démarche adoptée pour caractériser les interactions à l'échelle moléculaire et les mécanismes d'assemblage de l'apo α -lactalbumine (apoLAC) et du lysozyme (LYS) en objets supramoléculaires. **Chapitre 1 :** Les premières étapes du mécanisme ont été étudiées par RMN afin d'identifier les acides aminés impliqués dans les interactions. **Chapitre 2 :** Les interactions au sein des microsphères ont quant à elles été sondées en évaluant les éventuels changements de structure secondaire par spectroscopie infrarouge et en tentant d'appliquer la méthode des échanges hydrogène/deutérium à notre système. **Chapitre 3 :** La croissance des particules sub-micrométrique, i.e. de taille intermédiaire entre les hétérodimères et les objets supramoléculaires, a été caractérisée par diffusion de lumière en réalisant des cinétiques d'assemblage en fonction des conditions physico-chimiques du milieu.

I. Etude bibliographique

1. Les protéines globulaires

Les protéines sont des polymères linéaires composés d'acides aminés α ; leurs fonctions carboxylique et amide sont portées par le même carbone (carbone α). Seulement vingt acides aminés existent et se distinguent par leur chaîne latérale (Ils sont présentés en annexe). La composition et les propriétés des chaînes latérales permettent de classer les acides aminés en quatre groupes principaux: acide, basique, hydrophile et hydrophobe. La diversité des protéines réside sur la combinaison (nombre et ordre) de ces vingt acides aminés. La fonction d'une protéine est intrinsèquement liée à sa structure, elle-même déterminée par sa composition en acides aminés. Les protéines globulaires possèdent une structure tridimensionnelle compacte. En effet, les atomes composant la protéine interagissent entre eux et avec les molécules du solvant, la chaîne polypeptidique est alors contrainte à se replier dans une structure tridimensionnelle unique et stable, appelée « état natif de la protéine ».

Après avoir décrit les différents niveaux de structuration d'une protéine globulaire nous rappellerons quelques éléments généraux sur la réaction de repliement.

1.1. Niveaux de structurations

1.1.1. Structure primaire

La structure primaire d'une protéine est décrite par l'ordre et la nature des acides aminés constituant la chaîne polypeptidique. Cette séquence est encodée dans le gène de la protéine. La transcription de l'ADN en ARN messager est suivie par la traduction de celui-ci par les ribosomes qui assemblent les acides aminés pour former la chaîne polypeptidique. Ceux-ci sont reliés par une liaison peptidique impliquant la fonction carboxylique d'un acide aminé et la fonction aminée du résidu suivant (Figure I-1A). La liaison peptidique est une liaison plane en résonance (Figure I-1B); les atomes de la liaison peptidique sont coplanaires et seuls deux angles de rotation sont autorisés (ϕ et ψ) au niveau des liaisons adjacentes (Figure I-1C). Cependant les chaînes latérales portées par le carbone α exercent un encombrement stérique qui limite leur rotation.

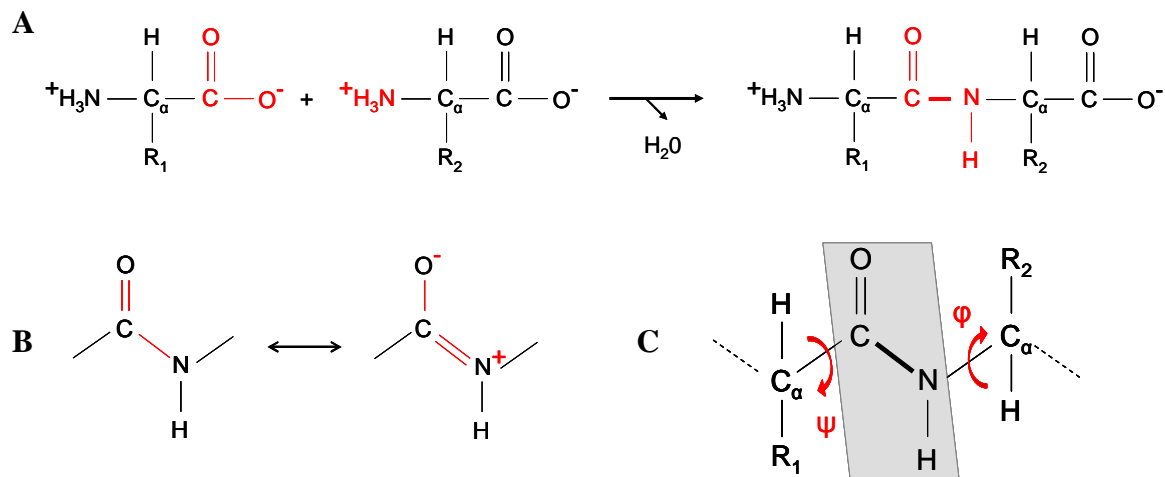


Figure I-1 : La liaison peptidique implique le groupement carboxylique d'un acide aminé et le groupement amine d'un autre acide aminé (**A**). Cette liaison est une liaison en résonance (**B**) ; les atomes de la liaison peptidique sont coplanaires et seuls deux angles de rotation sont autorisés (φ et ψ) (**C**).

1.1.2. Structure secondaire

Selon la nature des acides aminés, des interactions de faible énergie s'établissent entre atomes de la chaîne principale et/ou des chaînes latérales. Ces interactions seront décrites dans la seconde partie. Elles contraignent la chaîne polypeptidique à se replier localement. Les différentes conformations locales adoptées par la protéine définissent sa structure secondaire. Les deux principaux éléments de structure secondaire sont les hélices α et les feuillets β (Figure I-2). Ils résultent de la formation de liaisons hydrogènes entre atomes de la chaîne principale.

Les hélices α sont des structures périodiques, stabilisées par des liaisons hydrogènes établies entre le groupement carbonyle ($\text{C}=\text{O}$) d'un acide aminé i et le groupement amide ($\text{N}-\text{H}$) de l'acide aminé $i+4$ (Figure I-2A). Un tour d'hélice comprend 3.6 résidus dont les chaînes latérales sont dirigées vers l'extérieur de l'hélice. D'autres structures en hélice, moins abondantes que les hélices α , peuvent également être formées : les hélices 3_{10} et π qui sont stabilisées par des liaisons hydrogènes établies entre un résidu i et un résidu $i+3$ ou $i+5$ et qui comptent respectivement 3 et 4.1 résidus par tour.

Les structures en feuillets β sont composées de brins β stabilisés par des liaisons hydrogènes entre résidus distants et non consécutifs. Un brin est une structure étendue impliquant 5 à 10 résidus et orientée qui présente une polarité (du N-terminal vers le

C-terminal). Deux brins s'associent en feuillet par établissement de liaisons hydrogènes entre le groupement N-H d'un résidu d'un brin β et le groupement C=O d'un résidu d'un autre brin β . Les liaisons hydrogènes stabilisent la structure dans une conformation parallèle lorsque les brins sont dans la même orientation ou antiparallèle lorsque l'orientation des brins est alternée (Figure I-2B). La configuration antiparallèle est la plus fréquente (*Levitt and Chothia 1976*). Les liaisons hydrogènes sont dans le plan du feuillet et les chaînes latérales des résidus successifs sont dirigés alternativement au-dessus et au-dessous du feuillet (Figure I-2C).

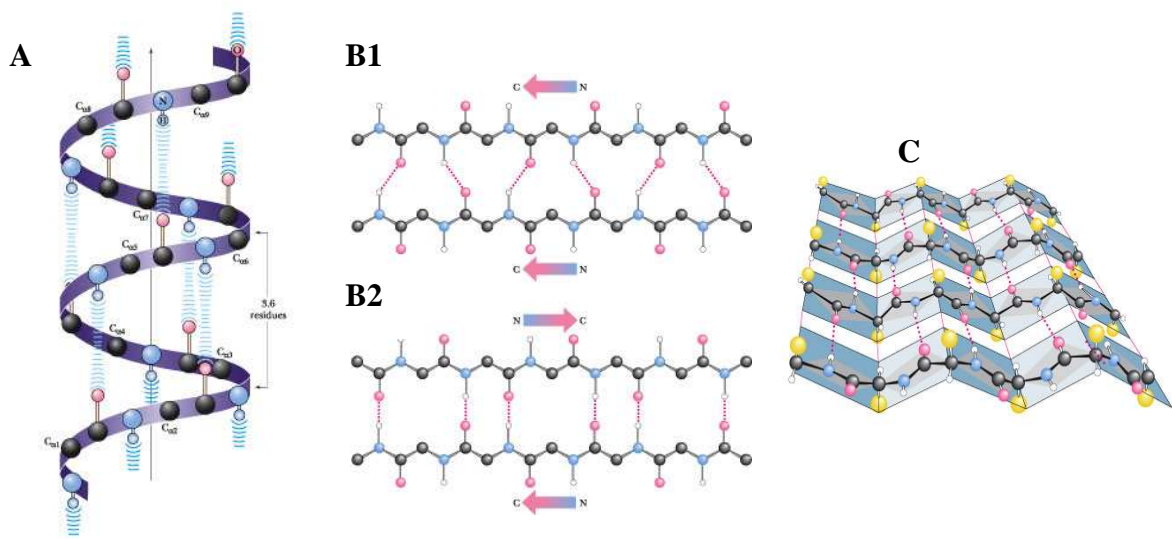


Figure I-2 : Les atomes de la chaîne principale établissent des liaisons hydrogènes (lignes bleues et roses en pointillé) de façon périodique et les résidus s'organisent localement en hélice α (A) ou en feuillet β en conformation parallèle (B1) ou antiparallèle (B2) (les chaînes latérales, symbolisés par des sphères jaunes (C), sont réparties de part et d'autre du feuillet).

Deux structures secondaires périodiques sont généralement reliées par une courbure particulière de la chaîne principale impliquant 3 ou 4 résidus consécutifs. Cette structure secondaire non périodique est appelée « coude ».

Enfin, les régions d'une protéine ne présentant aucune structure secondaire particulière définissent des « boucles » qui constituent les régions flexibles de la protéine.

1.1.3. Structure tertiaire

Les éléments de structures secondaires ainsi que les régions non structurées s'organisent spatialement par établissement d'interactions spécifiques entre chaînes latérales (*Dill 1990*). La structure tertiaire d'une protéine est définie par les coordonnées spatiales de chaque atome. Cette organisation vise à diminuer l'énergie conformationnelle de la protéine par enfouissement des résidus apolaires au cœur de la protéine et exposition en surface des résidus polaires et chargés. La structure tertiaire est principalement stabilisée par des interactions de faible énergie mais également par des liaisons covalentes, telles que les ponts disulfures qui sont formés par oxydation des groupements thiols de résidus cystéines proches spatialement.

Les éléments de structures secondaires s'organisent spatialement pour former des structures dites supersecondaires ou motifs (Figure I-3), dont les plus redondants sont le motif $\alpha\alpha$, l'épingle β , le motif $\beta\alpha\beta$ ou encore le motif clé grecque. Ce dernier motif peut être répété et est généralement retrouvé dans les protéines dites en tonneau β (*Zhang and Kim 2000*).

Les protéines globulaires sont alors classées selon leur contenu en hélice α et feuillets β (*Chothia et al. 1997*) (Figure I-4). Les protéines de la classe α ne contiennent que des hélices α , telle que la myoglobine (protéine impliquée dans le transport de l'oxygène), alors que celles de la classe β ne contiennent que des feuillets β , telle que OmpA (protéine membranaire bactérienne). Cependant la majorité des protéines sont composées des deux types de structure secondaire dans des proportions variables et peuvent appartenir aux classes α/β ou $\alpha+\beta$, selon qu'elles contiennent respectivement une alternance d'hélices et de feuillets, telle que la subtilisine (endopeptidase de *Bacillus Subtilis*) ou une répartition de ces éléments dans différentes régions, appelées domaine α et domaine β , telle que le lysozyme (enzyme antibactérienne).

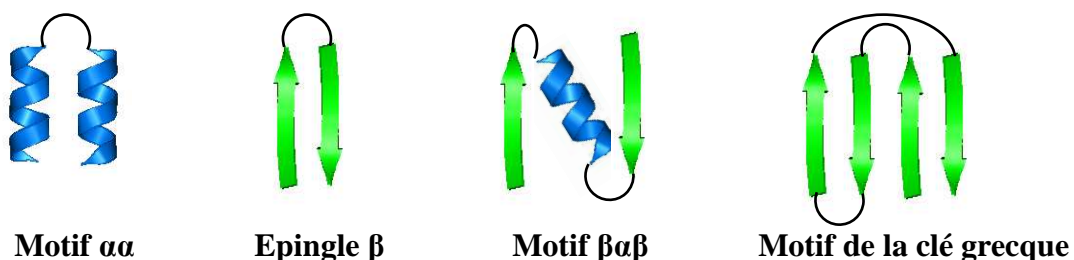


Figure I-3 : Les éléments de structure secondaires s'organisent spatialement en structures supersecondaires, selon le motif $\alpha\alpha$, l'épingle β , le motif $\beta\alpha\beta$ ou le motif clé grecque.

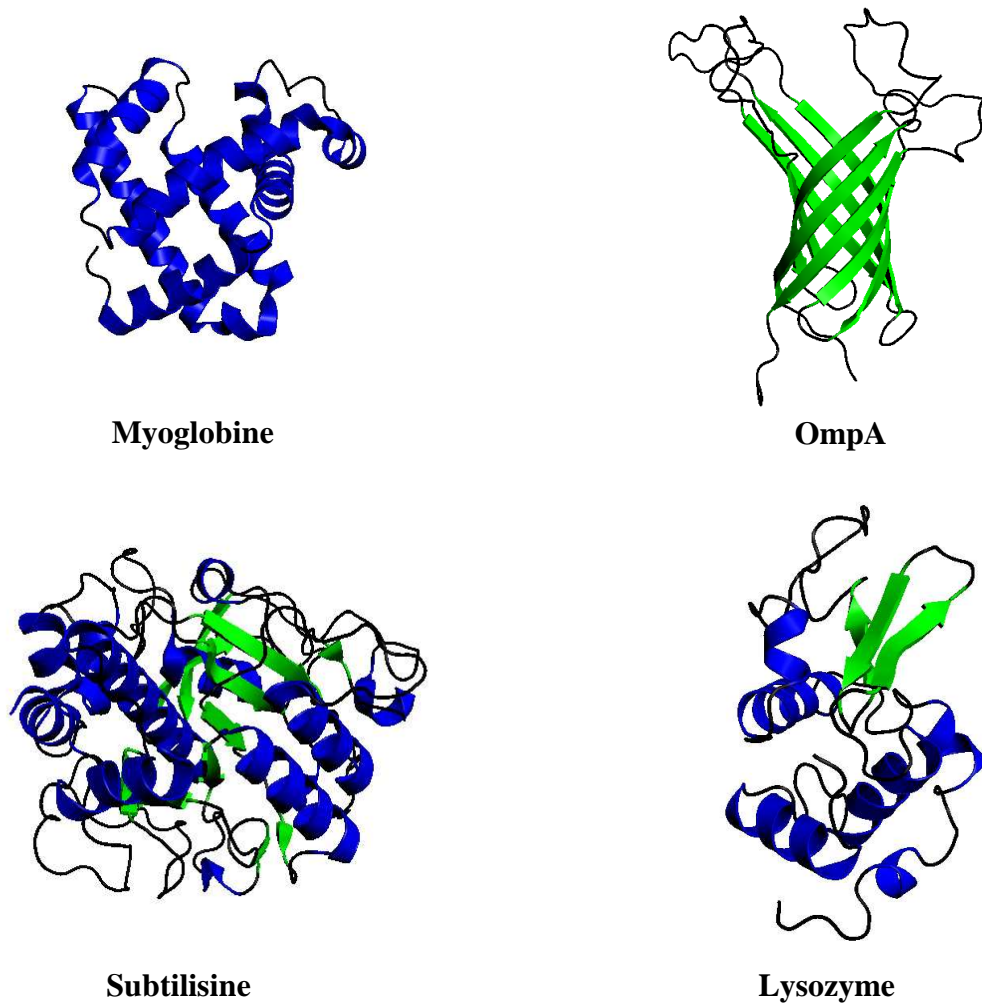


Figure I-4: Selon le contenu en hélice α (représentée en bleu) et feuillets β (représentés en vert), les protéines globulaires appartiennent à la classe α (myoglobine), la classe β (OmpA) et les classes α/β (subtilisine) et $\alpha+\beta$ (lysozyme). Les figures ont été produites avec Pymol et les fichiers pdb correspondant (3NML, 2GE4, 3LPC et 4LZT).

Une protéine globulaire présente donc des régions structurées et des régions flexibles. Les portions structurées, rigides, constituent la « charpente » de la protéine alors que les régions flexibles sont essentielles pour les adaptations conformationnelles nécessaires à sa fonction. Les protéines sont des molécules dynamiques : leur conformation native fluctue selon des changements conformationnels subtiles de la chaîne principale et surtout des chaînes latérales.

1.1.4. Structure quaternaire

Certaines protéines ne sont fonctionnelles qu'après assemblage de plusieurs chaînes peptidiques. Ce niveau de structuration est appelé structure quaternaire. L'assemblage est une oligomérisation d'unités monomériques identiques (hémoglobine) ou différentes (ADN polymérase). Les sous-unités peuvent être impliquées dans la reconnaissance et la fixation d'un substrat ou dans une fonction catalytique.

La Figure I-5 illustre les différents niveaux de structuration d'une protéine globulaire.

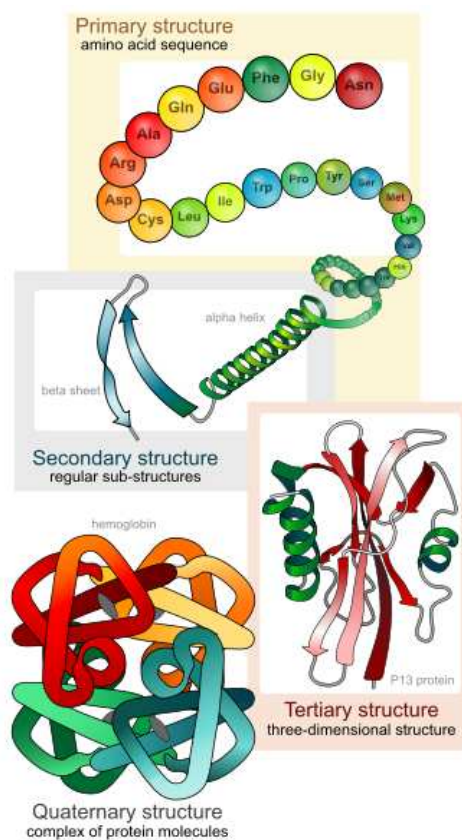


Figure I-5 : Une protéine globulaire peut présenter jusqu'à quatre niveaux de structuration : la structure primaire correspond à la séquence en acide aminé, la structure secondaire à l'organisation locale des résidus, la structure tertiaire à l'organisation spatiale des éléments de structure secondaire et la structure quaternaire à l'assemblage de sous-unités polypeptidiques. L'ensemble est stabilisé par des interactions de faible énergie et des liaisons covalentes telles que les ponts disulfures.

1.2. Repliement et intermédiaires partiellement repliés

Lors de la synthèse des protéines par les ribosomes, le repliement d'une protéine est la transition de son état déplié (chaîne polypeptidique naissante) à sa conformation globulaire native.

Suite à des expériences de repliement de la ribonucléase, Anfinsen a été le premier à montrer que le repliement d'une protéine globulaire est un phénomène spontané et réversible qui dépend uniquement de l'ordre des acides aminés dans la chaîne et donc de la structure primaire (*Anfinsen and Haber 1961*). De plus cet auteur émet une hypothèse thermodynamique du repliement en postulant que l'état natif de la protéine est l'état qui possède l'énergie libre la plus basse (*Anfinsen 1973*).

Le repliement des protéines a été largement étudié in vitro par des expériences de dénaturation/renaturation. L'état complètement dénaturé est obtenu par ajout de dénaturants chimique (urée, guanidine) ou des changements extrêmes de température et de pH. Le repliement est initié en plaçant la protéine dans des conditions natives. Les réactions peuvent être suivies par diverses techniques de biophysique renseignant sur l'état de structuration de la protéine, telles que la fluorescence intrinsèque (résidus tryptophanes), le dichroïsme circulaire, la spectroscopie infrarouge et spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) (*Radford 2000*). Le développement d'appareils de mélange rapide a permis de suivre les premiers événements de la réaction de repliement par ces techniques (*Plaxco and Dobson 1996*), celle-ci s'opérant en quelques secondes ou millisecondes (*Van Nuland et al. 1998*).

Une protéine ne se replie pas en explorant toutes les configurations possibles. Des considérations statistiques simples, comparant le nombre de configuration possible à partir du nombre d'acides aminés d'une protéine et la vitesse avec laquelle la protéine passe d'une configuration à une autre, ont amené Levinthal à proposer l'existence d'un chemin préférentiel de repliement ainsi que la présence d'intermédiaires de repliement (*Levinthal 1968*).

Les intermédiaires de repliement ne sont pas toujours détectables, particulièrement dans le cas des petites protéines de moins de 100 acides aminés pour lesquelles le repliement est très rapide et décrit selon une transition tout-ou-rien entre les états dénaturé et natif. Cependant, le repliement de protéines contenant davantage de résidus suit généralement une réaction à plusieurs états impliquant des intermédiaires partiellement repliés.

Goldberg et coll. ont réalisé la première étude ayant mis en évidence la présence d'intermédiaires réactionnels lors du repliement de la tryptophanase (protéine homotetramérique composée de sous-unités de 52.8 kDa) (*London et al. 1974*). Ces intermédiaires réactionnels présentent une partie de la structure secondaire native ou plus généralement un cœur replié ressemblant à celui de la conformation native, le reste de la protéine étant désordonné ou dans une conformation instable.

Parmi ces intermédiaires de repliement présentant des proportions variables de structures secondaire et tertiaire, Kuwajima et ses collègues ont mis en évidence un état intermédiaire particulier, appelé globule fondu ou « molten globule » (*Kuwajima et al. 1976*). Ces auteurs ont observé cet intermédiaire lors de l'étude de la dénaturation de l' α -lactalbumine. Cet état partiellement replié présente les structures secondaires natives mais pas de structure tertiaire stable. Plus tard il a été retrouvé au cours du repliement de nombreuses protéines telles que, l'anhydrase carbonique (*Dolgikh et al. 1984*), l'actine (*Kuznetsova et al. 1988*), l' α -lactalbumine (*Kuwajima 1996*), l'apo myoglobine (*Fink et al. 1998*) et le lysozyme (*Radford et al. 1992*). Dans certains cas cet intermédiaire cinétique peut être stabilisé en plaçant la protéine dans des conditions douces de dénaturation, ce qui a permis sa caractérisation structurale (*Christensen and Pain 1991*). Le « molten globule » est aujourd'hui considéré comme un intermédiaire de repliement universel des protéines de plus de 100 acides aminés.

Ces études in vitro ont permis de proposer plusieurs mécanismes de repliement (*Bushmarina et al. 2005*). Ceux-ci sont schématisés en Figure I-6.

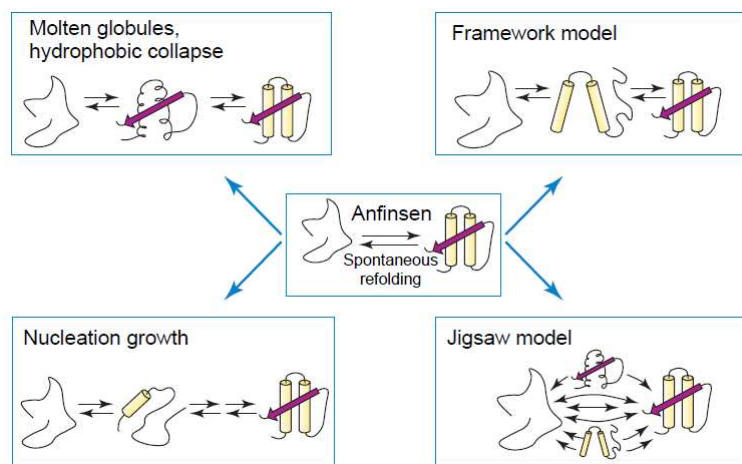


Figure I-6 : Différents mécanismes de repliement établis par des études in vitro (*Radford 2000*).

Le modèle d'effondrement hydrophobe (« hydrophobic collapse ») suppose que le premier événement du repliement est la formation du cœur hydrophobe (*Dill 1990*) ayant lieu avant la formation de structures secondaires. Ce collapse permet de minimiser le nombre de chaînes latérales hydrophobes exposées au milieu aqueux et amène les résidus polaires à compenser leur désolvatation en formant des interactions favorables telles que des liaisons hydrogènes résultant en la formation d'éléments de structure secondaire. Plusieurs modèles proposent l'existence d'une étape de nucléation et supposent que le repliement est coopératif. La structuration de la protéine est rapidement propagée à l'ensemble de la chaîne polypeptidique après que la formation des éléments de structure secondaire ait débuté localement (mécanisme de nucléation croissance) ou à plusieurs endroits de la chaîne polypeptidique (modèle « framework » (*Ptitsyn and Rashin 1973*)). Le repliement peut être séquentiel mais l'hypothèse la plus probable est que plusieurs chemins parallèles sont impliqués (modèle « Jigsaw puzzle » (*Harrison and Durbin 1985*)).

La description actuelle du repliement des protéines rassemble ces considérations cinétiques et énergétiques sous la forme de paysage d'énergie (Figure I-7).

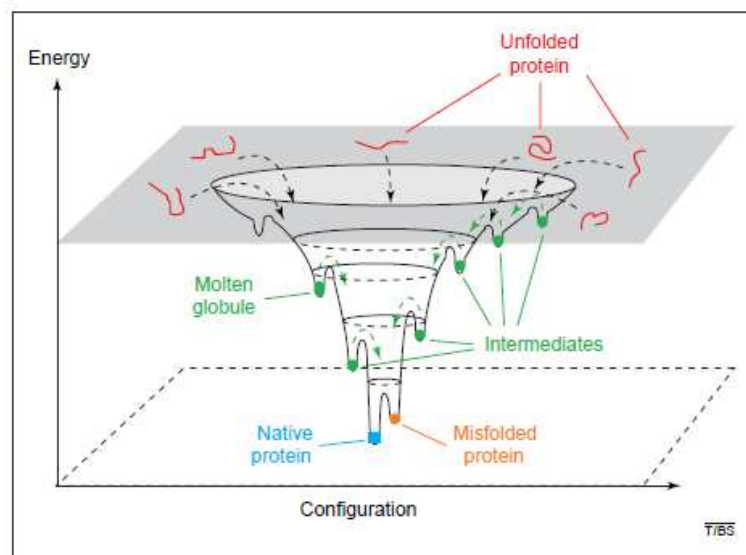


Figure I-7 : Représentation schématique du paysage énergétique de repliement. La chaîne polypeptidique dénaturée présente une énergie élevée et se replie dans son état natif, de plus basse énergie, suivant une variété de chemins qui impliquent des intermédiaires de repliement représentés par des minima locaux d'énergie. Plus la protéine se replie, plus son entropie conformationnelle diminue (largeur de l'entonnoir). (*Radford 2000*).

Le concept de paysage d'énergie est apparu au cours des années 1990 (*Bryngelson et al. 1995*). Il représente l'ensemble des états dénaturés, partiellement repliés et natif sous la forme d'un entonnoir et donne une illustration statistique des différents chemins possibles de repliement. L'axe vertical indique la différence d'énergie entre l'état dénaturé et l'état natif et correspond au changement de l'enthalpie au cours du repliement. La largeur de l'entonnoir à une hauteur donnée correspond à l'entropie conformationnelle dans un état. Les états dénaturés sont des ensembles dynamiques ; leurs conformations sont en interconversion rapide et présentent une énergie élevée et équivalente. Au contraire, les intermédiaires de repliement présentent différents niveaux de structuration et donc d'énergie. L'état natif correspond à une conformation unique, celle de plus basse énergie. Tandis que le repliement de la structure progresse vers son état natif, le nombre de conformations à explorer diminue, ce qui se traduit par une diminution de l'entropie conformationnelle. La cinétique de repliement est représentée par la pente d'un chemin de l'entonnoir. Les puits intermédiaires correspondent à des minima locaux d'énergie, peuplés d'intermédiaires transitoires ou d'intermédiaires mal repliés.

Ces intermédiaires de repliement peuvent se trouver sur le chemin de repliement menant à l'état natif ou se trouver en dehors du chemin de repliement. La réorganisation des structures qu'ils contiennent peut aboutir à la conformation native mais ils sont souvent propices à l'agrégation (*London et al. 1974; Mittraki and King 1989; Wetzel 1996*). En effet, les intermédiaires de repliement sont des centres de nucléation pour la formation d'agrégats du fait de l'exposition de régions hydrophobes à la surface de la protéine. A l'inverse d'un état complètement dénaturé où les chaînes latérales hydrophobes sont réparties d'une façon aléatoire sur toute la chaîne polypeptidique définissant plusieurs petites régions hydrophobes, les régions hydrophobes exposées à la surface d'un intermédiaire de repliement sont larges et définissent des surfaces hydrophobes contiguës qui favorisent son agrégation (*Fink 1998*). In vivo, des molécules chaperonnes catalysent le repliement des protéines. Elles se lient aux intermédiaires partiellement dépliés au niveau de leur poche hydrophobe et assiste leur repliement en empêchant leur agrégation (*Voisine et al. 2010*). Cependant, comme nous allons le voir dans le chapitre dédié aux assemblages protéiques en biologie (paragraphe I-3.2.4), la déficience d'un tel processus peut provoquer l'agrégation anormale de protéines mal repliées et engendrer des dépôts létaux pour les cellules.

2. Les interactions protéine-protéine

Les forces régissant les interactions protéine-protéine sont identiques à celles impliquées dans la stabilité conformationnelle et la solubilité des protéines. Par conséquent, tous les facteurs extrinsèques influençant la stabilité et la solubilité des protéines pourront également favoriser ou empêcher les interactions protéine-protéine. Nous allons brièvement présenter les paramètres physico-chimiques influençant la stabilité d'une protéine avant de décrire les différentes forces impliquées dans les interactions protéine-protéine. Nous aborderons ensuite les aspects thermodynamiques des interactions protéine-protéine et nous présenterons également les outils informatiques utilisés pour leurs prédictions.

2.1. Stabilité et solubilité d'une protéine globulaire

La stabilité conformationnelle d'une protéine résulte des interactions intramoléculaires et sa solubilité est principalement régie par les interactions entre les résidus présents à sa surface et le solvant.

Alors que les résidus apolaires présentent une aversion pour les molécules d'eau, les résidus chargés et polaires établissent des interactions de type dipôle-dipôle et dipôle-ion avec les molécules d'eau du solvant. L'eau est donc structurée autour de la protéine et forme une couche d'hydratation qui crée une gêne stérique au rapprochement des protéines. D'autre part, les résidus chargés en surface attirent les contre-ions et repoussent les co-ions par des interactions électrostatiques formant une double couche ionique autour de la protéine. Un gradient de potentiel existe dans cette double couche et est défavorable au rapprochement de deux molécules de protéine par répulsion électrostatique.

La modification des conditions physico-chimiques du milieu, tels que le pH, la force ionique et la température peuvent altérer la balance entre force attractives et répulsives au sein de la protéine et avec le solvant et réduire à la fois sa stabilité et sa solubilité (*Hardy et al. 2008*).

En effet, les protéines sont des polyélectrolytes et les charges portées par les chaînes latérales sont dépendantes du pH de la solution. Le point isoélectrique (pI) d'une protéine correspond à la valeur du pH où le nombre de charges positives est égal à celui des charges négatives. Par conséquent, la protéine porte un excès de charges positives lorsque le pH est

inférieur au pI et un excès de charges négatives lorsque le pH est supérieur au pI. La solubilité d'une protéine est réduite à son pI du fait de la réduction de charges à sa surface et donc des forces électrostatiques répulsives.

Une faible force ionique tend également à améliorer sa solubilité (salting in) du fait de la formation d'une double couche d'hydratation riche en ions à proximité des résidus polaires et chargés. Au contraire, de fortes concentrations en sel ont tendance à diminuer sa solubilité par (i) réduction de la couche d'hydratation (salting out) car les molécules d'eau sont réquisitionnées par les ions en solution et (ii) écrantage des charges à la surface de la protéine par établissement de ponts salins entre les résidus chargés et les solutés. L'amplitude de cet effet est dépendante de la nature des ions et suit généralement la série d'Hofmeister (*Perez-Jimenez et al. 2004; Zhang and Cremer 2006*).

La stabilité de la protéine dépend également de la température. La température à laquelle s'effectue la transition de son état structuré natif à son état déplié s'appelle la température de dénaturation (T_m). Cette température dépend de la composition en acides aminés mais également des paramètres physico-chimiques de la solution. L'augmentation de la température a deux effets importants : d'une part la déstructuration de l'eau et d'autre part le dépliement de la protéine provoquant l'exposition des régions hydrophobes à sa surface. Ces deux effets diminuent donc la solubilité des protéines par augmentation des forces attractives. La perte du caractère globulaire d'une protéine pendant le chauffage peut être attribuée à une augmentation de l'entropie de l'état déplié (*Creighton 1978*) et est en principe réversible.

La stabilité d'une protéine dépend donc de ses propriétés intrinsèques (définies par sa séquence en acides aminés) et peut être modulée en fonction des conditions physico-chimiques. Le degré de dénaturation d'une protéine est la conséquence d'une balance altérée entre les différentes forces stabilisatrices. Il est défini par les changements conformationnels majeurs de sa structure native, sans altération de sa séquence en acides aminés (*Tanford 1968*). Dans des conditions douces de dénaturation, la dénaturation peut être ménagée et résulter en une déstabilisation partielle de la protéine.

2.2. Forces régissant les interactions protéine-protéine

Les forces gouvernant la stabilité des protéines et les interactions protéine-protéine peuvent être covalente ou de faible énergie (Tableau I-1). La force d'une liaison est définie comme l'énergie nécessaire pour rompre la liaison (kJ.mol^{-1}).

Type de liaison	Energie (kJ.mol^{-1})
Liaisons covalentes	200-800
Interaction hydrophobe	2-10
Liaisons de van der Waals	1-20
Liaisons hydrogènes	10-30
Interactions électrostatiques (pont salin)	25-50

Tableau I-1: Différentes forces impliquées dans la stabilité d'une protéine et les interactions protéine-protéine.

Les **liaisons covalentes** résultent de la mise en commun d'électrons entre deux atomes et nécessitent donc la proximité des atomes. Elles sont très énergétiques (200 à 800 kJ.mol^{-1}) et impliquent les groupements thiols des résidus cystéines pour former des ponts disulfures intermoléculaires par échange de ponts disulfures intramoléculaires ou oxydation des groupements thiols exposés à la surface des protéines.

Les **interactions hydrophobes** s'exercent entre des résidus apolaires. L'énergie de ces associations hydrophobes est de l'ordre de 2 à 10 kJ.mol^{-1} . Elles sont de nature entropique et sont favorisées à des températures élevées. La majorité des acides aminés apolaires étant enfouie au cœur des protéines, les interactions hydrophobes entre protéines sont favorisées lorsque l'une d'entre elles est partiellement dépliée présentant des résidus apolaires à sa surface.

Les **liaisons de Van der Waals** sont des liaisons non spécifiques qui s'établissent à courte distance (0.2-10 nm). La distribution asymétrique des charges électroniques autour d'un atome lui confère un moment dipolaire. Ce dipôle peut interagir avec un autre dipôle (interaction de type dipôle-dipôle) ou altérer la distribution électronique des atomes voisins (interaction de type dipôle-dipôle induit) ce qui entraîne la mise en place de liaisons de Van der Waals entre ces atomes. Ce sont des forces attractives, provoquant le rapprochement des atomes, et elles deviennent répulsives lorsque les atomes sont trop proches du fait de

l'impénétrabilité de leur nuage électronique (potentiel de Lennard-Jones). Leur énergie (1 à 20 kJ.mol⁻¹) est proportionnelle à $1/r^3$, $1/r^4$ ou $1/r^6$ (r : distance entre atomes, Å) selon le type d'interaction.

Les **liaisons hydrogènes** s'établissent à courte distance (~0.2 nm) et consistent en l'échange d'électrons entre un atome d'hydrogène (accepteur) lié à un atome électronégatif (N, O) avec un autre atome électronégatif (donneur). Leur énergie (10-30 kJ/mol) dépend de l'électronégativité des atomes et est maximale lors que les deux atomes électronégatifs et de l'atome d'hydrogène sont alignés. Elles sont stabilisées à basse température.

Les **interactions électrostatiques** sont répulsives (entre protéines de charges égales) ou attractives (entre protéines portant des charges opposées). Leur énergie (25-50 kJ/mol) dépend des charges portées par les atomes impliqués. Une paire ionique, ou pont salin, est formée par association de deux charges discrètes, portées par un résidu chargé et un ion en solution ou par deux résidus chargés. Dans le cas d'interaction protéine-protéine, leur énergie dépend des charges (Q_1 et Q_2) portées par les deux protéines, de la distance séparant les protéines (r) et de la constante diélectrique du milieu (ϵ_r) selon la loi de Coulomb :

$$F = \frac{Q_1 Q_2}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r r^2} \quad (\epsilon_0 \text{ étant la constante diélectrique du vide})$$

Contrairement aux autres forces de faible énergie, les interactions électrostatiques s'exercent sur des distances relativement grandes (20 nm). La force de ces interactions est aisément modulée en ajustant le pH et la force ionique du milieu. Ces deux paramètres permettent en effet de contrôler la distribution des charges à la surface de la protéine.

Cette distribution de charges définit le potentiel électrostatique d'une protéine. Le potentiel électrostatique d'une charge Q à la surface d'une protéine en solution contenant des ions est décrit par l'équation suivante :

$$\Phi(r) = \frac{Q}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r r} . e^{-r/D_e}$$

où D_e est la distance d'écrantage de Debye. Ce paramètre est fonction de la force ionique I selon la relation :

$$D_e = \sqrt{\frac{\epsilon_0\epsilon_r k_B T}{2I}}$$

où k_B est la constante de Boltzmann et T est la température absolue.

Une augmentation de la force ionique induit donc une diminution de la distance de Debye par écrantage des charges. La longueur d'écrantage de Debye permet de modéliser la force des interactions électrostatiques. Dans le cas d'un système monoprotéique, une augmentation de la force ionique favorise l'agrégation de la protéine par diminution des forces électrostatiques répulsives ; ce principe de « salting out » est utilisé par les études de cristallographie (*Curtis et al. 2002*). Inversement, dans le cas d'interactions électrostatiques entre protéines portant des charges opposées, l'augmentation de la force ionique du milieu est défavorable aux interactions protéine-protéine du fait de l'écrantage des charges complémentaires résultant en une diminution des forces électrostatiques attractives (*Biesheuvel et al. 2006*).

2.3. Paramètres thermodynamiques des interactions protéine-protéine

Les interactions protéine-protéine permettent de minimiser l'énergie libre d'un système ($\Delta G < 0$), définie selon la deuxième loi de thermodynamique, reliant les variations d'enthalpie (ΔH) et d'entropie (ΔS) selon la relation: $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$.

La variation d'enthalpie du système correspond aux contributions énergétiques résultant des liaisons covalentes et non covalentes établies entre les molécules du solvant et la protéine (enthalpie de solvation) et entre les protéines impliquées (enthalpie de liaisons). La variation d'enthalpie est favorable à l'association de protéines ($\Delta H < 0$) lorsque les interactions établies entre les protéines compensent totalement les interactions de chacune des protéines avec le solvant avant leur complexation.

La variation d'entropie mesure l'état de désordre du système. Elle résulte de la somme des variations de l'entropie de solvation (ΔS_{sol}), de l'entropie conformationnelle (ΔS_{conf}) et de l'entropie translationnelle/rotationnelle ($\Delta S_{u/r}$) des protéines impliquées. La variation d'entropie est favorable à l'association des protéines ($\Delta S > 0$) lorsque l'augmentation de l'entropie de solvation liée à la libération des molécules d'eau et contre-ions initialement liés aux protéines est supérieure à la diminution d'entropie de la protéine (ΔS_{conf} , $\Delta S_{u/r}$) du fait des contraintes qui limitent les mouvements des chaînes polypeptidiques.

Un système est dit enthalpique lorsque l'association est favorisée par diminution de l'enthalpie ($\Delta H < 0$), alors qu'un système entropique implique une augmentation de l'entropie

($\Delta S > 0$). Les contributions enthalpique (ΔH) et entropique (ΔS) de l'énergie libre sont dépendantes de la température et peuvent être mesurées globalement par des techniques de calorimétrie. Les différentes contributions entropiques sont difficilement mesurables indépendamment. Comme présenté dans le paragraphe suivant (I-2.4.2), la dynamique moléculaire est un outil informatique utilisé pour estimer l'effet de la libération des contraintes ou de la diminution d'entropie conformationnelle sur les variations d'énergie du système.

La stabilité des interactions régissant la formation d'un complexe entre deux protéines P_1 et P_2 peut être évaluée en calculant les valeurs de constantes d'association (K_a) et de dissociation (K_d). Un équilibre simple monomères-dimère est défini par l'équation suivante :

$$P_1 + P_2 \leftrightarrow P_1P_2 \text{ avec } K_d = \frac{[P_1][P_2]}{[P_1P_2]} = \frac{1}{K_a}$$

où $[P_1]$, $[P_2]$ et $[P_1P_2]$ sont les concentrations à l'équilibre en protéines libres et complexées à l'équilibre. Ces constantes sont reliées à l'énergie libre standard du système (ΔG^0), selon l'équation : $\Delta G^0 = -RT \ln(K_d)$, où R est la constante des gaz parfaits et T la température absolue. Cette égalité provient de l'équation de Gibbs qui décrit la variation d'énergie libre du système selon : $\Delta G = \Delta G^0 + RT \ln(K)$. A l'équilibre, la variation d'énergie libre est nulle et la variable K (rapport molaire des concentrations en espèces présentes) est égale au K_d .

Les valeurs de K_d sont propres à chaque système et peuvent s'échelonner du micromolaire au picomolaire, résultant en une variation de l'énergie libre de -6 à -19 kJ.mol⁻¹ (*Keskin et al. 2008*).

2.4. Prédiction des interactions protéine-protéine

La prédiction des interactions protéine-protéine joue un rôle important en biologie pour comprendre les voies métaboliques et leur régulation mais aussi en pharmacologie pour la découverte de nouveaux médicaments ou encore en agro-alimentaire pour l'élaboration de nouveaux ingrédients fonctionnels. Les interactions protéine-protéine sont gouvernées par les différentes interactions présentées précédemment et la contribution de chacune des forces dépend du système étudié.

Nous allons dans un premier temps présenter les méthodes de prédictions fondées sur des études structurales des interfaces de complexes protéiques puis présenter les approches de simulation par dynamique moléculaire permettant d'évaluer les composantes thermodynamiques des interactions protéine-protéine.

Cette synthèse n'inclut pas les nombreux travaux étudiant les interactions protéine-protéine dans le but d'établir les conditions nécessaires à la cristallisation des protéines. Nous nous intéressons plus particulièrement aux méthodes informatiques permettant de prédire la formation de complexes et celles permettant de comprendre les forces gouvernant les interactions protéine-protéine impliquées dans la formation de complexes stabilisés par des interactions faibles.

2.4.1. Analyse structurale des interfaces protéine –protéine

Puisque les interfaces des complexes protéine-protéine sont composées de résidus présents à la surface des protéines, de nombreuses études se focalisent sur la composition en acides aminés à la surface des protéines pour prédire les associations protéiques (*Keskin et al. 2008*). Ces études structurales visent également à établir des propriétés spécifiques aux interfaces les distinguant du reste de la surface des protéines.

L'analyse comparative de structures cristallographiques de différents complexes protéiques a montré que les surfaces des protéines complexées montrent souvent un degré élevé de complémentarité structurale (*Nooren and Thornton 2003*). Les protrusions de surface d'un partenaire s'associent généralement aux cavités de surface de l'autre protéine. Cette complémentarité structurale est dans de nombreux cas une caractéristique incontestable gouvernant la spécificité des interactions protéine-protéine.

Jones et Thornton ont comparé l'hydrophobie moyenne des interfaces protéine-protéine à celle de la surface et du cœur des protéines (*Jones and Thornton 1997*). Nous avons vu précédemment que l'organisation spatiale des résidus d'une protéine tend à minimiser son énergie libre conformationnelle par enfouissement des résidus apolaires au cœur de la protéine et exposition des résidus polaires et chargés en surface. Il n'est donc pas surprenant que l'hydrophobie moyenne de la surface des protéines soit négative alors que l'hydrophobie moyenne au cœur de la protéine soit positive. Ces auteurs ont montré que

seules les interfaces de complexes homodimériques permanents, dont les protéines ne sont fonctionnelles que sous leur forme complexée, présentent une hydrophobie moyenne positive. Au contraire, les interfaces de complexes transitoires, tels que les hétérodimères enzyme-substrat ou antigène-anticorps, sont quand à elles beaucoup plus polaires et leur hydrophobie ne se distinguent pas de celle de la surface des protéines constitutives.

Le rôle joué par la chaîne latérale d'un acide aminé à l'interface est communément déterminé expérimentalement par mutation dirigée. En générale les résidus sont mutés par une alanine dont la chaîne latérale se résume à un groupement méthyle. Cette méthode n'est évidemment applicable que si la mutation n'engendre pas de changements structuraux majeurs. Des techniques traditionnelles de calorimétrie permettent de mesurer l'influence de cette mutation sur l'affinité du complexe et d'identifier les résidus dont la mutation est défavorable à l'interaction, appelés « hot spots ». La comparaison des résultats obtenus par cette méthode a montré que la mutation de résidus polaires et chargés résultait en une déstabilisation des complexes et que ces « hot spots » étaient majoritairement localisés au centre de l'interface où ils sont protégés du solvant (*Bogan and Thorn 1998*).

De nombreux travaux se focalisent également sur l'exploitation de l'ensemble des informations aujourd'hui disponibles provenant du séquençage du génome. Pour certaines protéines dont la structure cristallographique est connue, il existe un ensemble de protéines homologues provenant d'un gène ancestral dont seule la séquence en acides aminés a été déterminée. En supposant raisonnablement que des protéines homologues interagissent avec leur ligand d'une manière relativement similaire, la comparaison de leur séquence permet de distinguer les acides aminés qui peuvent être mutés sans abolir l'interaction de ceux qui doivent être conservés pour maintenir l'association. En effet, il a été montré que les résidus « hot spots » des interfaces présentent un fort degré de conservation de séquence (*Nooren and Thornton 2003; Keskin et al. 2008*). Une première prédiction des sites potentiels d'interaction peut donc être réalisée par comparaison des structures et séquences de protéines homologues.

2.4.2. Prédiction par simulations moléculaires

La recherche de complexes dont les protéines montrent la plus haute complémentarité de surface est le fondement de la plus part des algorithmes informatiques utilisés pour prédire les structures des complexes protéiques.

En effet, tous les complexes protéiques ne peuvent être cristallisés, en particulier ceux résultant d'interactions faibles. L'arrimage moléculaire (« docking ») est une méthode de modélisation moléculaire visant à prédire correctement la structure d'un complexe protéique mis en évidence expérimentalement en considérant les structures cristallographiques connues des protéines le composant. Pour sélectionner les orientations les plus favorables, les algorithmes utilisent des fonctions énergétiques simplifiées afin de tester un maximum d'orientations en un temps raisonnable. Les protéines sont traitées comme des corps rigides mais certaines approches d'affinement de structure prennent en compte les degrés de liberté conformationnelle des chaînes latérales (*Schueler-Furman et al. 2005*). Enfin des données expérimentales, telle qu'une liste de résidus impliqués dans l'interaction, peuvent être implémentés à certains programmes de docking afin d'affiner les résultats (*van Dijk et al. 2006*).

Le « docking » est une méthode également utilisée lors du criblage rapide d'un large jeu de données structurales et génomiques pour prédire les interactions protéine-protéine (*Aytuna et al. 2005*). Des équivalents structuraux (homologie de séquence et de surface) de chacune des deux protéines formant un complexe sont recherchés parmi les bases de données disponibles (PDB par exemple) puis les partenaires ciblés sont associés deux à deux pour prédire la formation de complexes.

Cependant, ces approches ne permettent pas de modéliser l'effet des paramètres physico-chimiques du milieu sur les propriétés de surface des protéines. Or pour de nombreux complexes, la complémentarité électrostatique est un facteur tout aussi important que la complémentarité structurale (*Sheinerman et al. 2000*). Les régions d'une protéine présentant un potentiel électrostatique positif s'associent aux régions de la protéine partenaire présentant un potentiel électrostatique négatif.

La combinaison des méthodes de simulation à la dynamique moléculaire permet de modéliser l'influence des paramètres physico-chimiques sur le caractère répulsif ou attractif des interactions protéine-protéine.

La dynamique moléculaire étudie le comportement dynamique d'une protéine en solution, qui suit la théorie du mouvement brownien décrite par l'équation de Langevin. Cette équation corrèle l'accélération des particules à leur vitesse de diffusion, leur masse molaire et un terme traduisant l'effet de la température et de la viscosité sur ce mouvement. La dynamique brownienne est communément utilisée pour étudier les réactions dont la vitesse est limitée par la diffusion des molécules et pour déterminer les constantes d'association des protéines. Elle permet également d'établir des modèles structuraux et dynamiques pour la compréhension ou la prédiction de résultats expérimentaux, tels que l'effet de mutations. L'implémentation d'algorithmes résolvant l'équation non linéaire de Poisson-Boltzmann, permet de modéliser les forces électrostatiques impliquées dans l'interaction entre deux protéines en prenant en compte le potentiel électrostatique de chaque protéine et l'effet du solvant sur la densité de charge à la surface de celles-ci (*Elcock et al. 2001*). En effet un des termes de cette l'équation est fonction de la longueur de Debye et renseigne donc sur l'effet de la force ionique du milieu sur la force des interactions électrostatiques.

Lors des simulations par dynamique moléculaire, les protéines sont modélisées par des sphères pleines dans les modèles « gros grain » (coarse-grain models) et des modèles de plus haute résolution (fine-grain) représentent chaque acide aminé par une sphères dont le volume est ajusté de façon à ce que le volume total de la protéine corresponde à celui déterminé par cristallographie. Des modèles atomistiques représentent chaque atome de la protéine par une sphère (Figure I-8). Dans chaque modèle, chaque sphère peut être chargée ou neutre. Pour réduire la charge de calcul, seulement une chaîne de polymère dans une conformation donnée est considérée et le solvant est généralement représenté par un continuum non structuré. C'est une description implicite du solvant qui permet de moyennner toutes les configurations possibles des molécules du solvant. Dans certains cas, une partie du solvant, comme les sels ajoutés au modèle pour mimer l'effet de la force ionique, est décrite d'une manière explicite. Chaque particule chargée est représentée par une sphère pleine chargée. Les simulations moléculaires sont effectuées dans des espaces de taille finie modélisés par un volume cubique ou sphérique dans lequel les protéines sont libres de se mouvoir par rotation et translation et où les particules chargées du solvant suivent un déplacement aléatoire (Figure I-8).

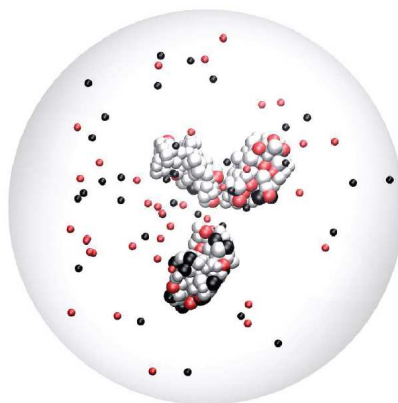


Figure I-8 : Image de simulation moléculaire. Le solvant est décrit selon un continuum non structuré (arrière plan gris), les molécules de sels et les protéines sont représentées par des sphères chargées positivement (noir) et négativement (rouge). (*Persson et al. 2009*)

Le phénomène de relargage de contre-ions par condensation de deux polyélectrolytes de charges opposées a été étudié par dynamique moléculaire (*Ou and Muthukumar 2006*). La Figure I-9 présente les différentes étapes caractéristiques : les deux chaînes diffusent librement (a) et lorsqu'elles se rencontrent (b), elles se chevauchent (c) et collapsent en un globule compact (d) avec relargage simultané des contre-ions initialement associés aux polyélectrolytes. Les monomères chargés de chaque polymère présentent une affinité plus importante pour leurs analogues de charge opposée présents sur l'autre polymère que pour leurs contre-ions. L'interaction entre les deux polymères est coopérative et résulte en une diminution rapide de leur taille par la formation d'un globule.

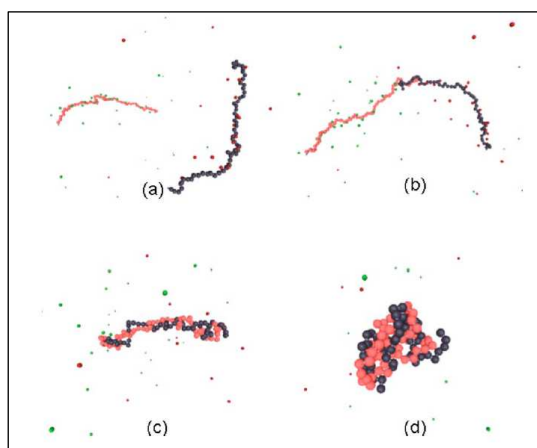


Figure I-9 : Image de simulation moléculaire à différentes étapes de la complexation de deux polymères portant des charges opposées (+ : rouge, - : noir). Les contre-ions sont représentés par des sphères (+ : rouge, - : vert). (a) : les polymères diffusent librement, (b) se rencontrent, (c) se chevauchent et (d) se contractent en un globule avec relargage en solution des contre-ions initialement associés. (*Ou and Muthukumar 2006*)

Ces auteurs ont également modélisé la contribution du relargage des contre-ions sur l'énergie libre du système en fonction de la quantité de charges portées par les polyélectrolytes. Lorsque les deux polyélectrolytes sont faiblement chargés, leur complexation est gouvernée par l'enthalpie de fixation résultant d'attractions électrostatiques, alors que le gain entropique dû au relargage de contre-ions est faible. Inversement, lorsque les deux polyélectrolytes sont fortement chargés, leur complexation est régie par le gain entropique dû au relargage de contre-ions et est défavorisée par les variations enthalpiques. Ils ont également mis en évidence que l'addition de sels réduisait l'enthalpie de complexation par écrantage des charges impliquées dans les interactions électrostatiques.

Des études combinant la dynamique moléculaire aux calculs classiques des contributions électrostatiques ont également mis en évidence l'accélération de la vitesse d'association de deux protéines portant des charges opposées par l'action de forces électrostatiques s'exerçant à longue distance. Ce phénomène décrivant le rapprochement accéléré de deux protéines par des attractions électrostatiques est connu sous le nom d'« electrostatic steering » (*Wade et al. 1998*). Les simulations par dynamique moléculaire ont montré que la vitesse d'association limitée par la diffusion ($10^{-5} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) pouvait être augmentée jusqu'à $10^{-9} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ en présence d'attractions électrostatiques. Tan et collaborateurs ont mis en évidence cet effet dans le cas des complexes formés par l'enzyme acétylcholinestérase avec son inhibiteur NMA (N-methylacridinium). NMA est chargé positivement et la vitesse de complexation est augmentée de plus d'un ordre de grandeur quand la protéine est chargée (site de fixation chargé négativement) en comparaison au modèle où la protéine ne porte aucune charge (*Tan et al. 1993*). Ce phénomène a également été mis en évidence par modélisation de l'effet de la force ionique sur la vitesse d'association dans le cas de complexes antigène-anticorps. A titre d'exemple, Kozack et coll ont montré une diminution de la vitesse d'association lorsque la force ionique du milieu augmente dans le cas du complexe formé par le lysozyme et son anticorps HyHEL-5 (*Kozack et al. 1995*). Un exemple largement étudié est le complexe barnase-bastar (*Schreiber and Fersht 1996; Camacho et al. 1999; Spaar et al. 2006*). L'étude de ce complexe a permis de mettre en évidence que l'« electrostatic steering » augmente la vitesse d'association des protéines pour former un complexe transitoire et qu'il provoque également une orientation préférentielle des protéines dans une configuration favorable à la formation du complexe permanent (Figure I-10). Cependant la comparaison de différents complexes dont la formation est gouvernée par

des attractions électrostatiques révèle que cet effet orientationnel n'est pas observé dans tous les cas (*Gabdouline and Wade 2001*).

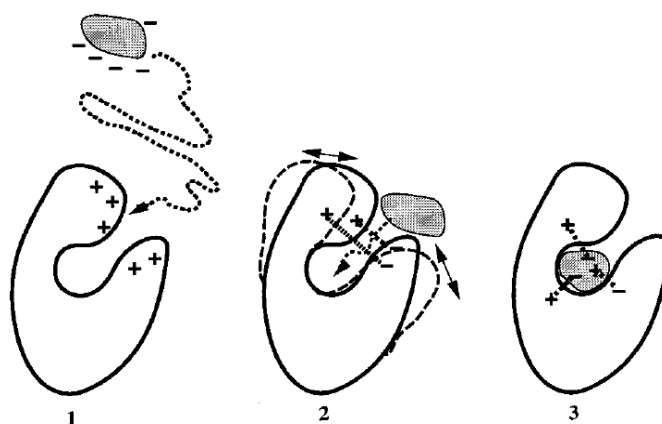


Figure I-10 : « Electrostatic steering » dans le cas d'un complexe enzyme-substrat. **1 :** les forces électrostatiques attractives s'exercent à longue distance, augmentent la vitesse de diffusion du ligand et l'attirent vers le site à la surface de l'enzyme portant des charges opposées. **2 :** les interactions électrostatiques influencent la dynamique de la protéine et favorisent la fixation du ligand. **3 :** Les interactions électrostatiques établies à courte distance définissent la spécificité de l'enzyme pour son substrat et sa fixation dans une configuration optimale. (*Wade et al. 1998*)

Une approche alternative à la dynamique moléculaire est la simulation moléculaire selon la méthode Monte Carlo. Cette méthode utilise une approche probabiliste qui considère un déplacement aléatoire des atomes. Une configuration moléculaire est choisie au hasard puis une nouvelle configuration est générée. Celle-ci n'est retenue que si la différence d'énergie entre cette conformation et la précédente est négative. Dans ce cas, la nouvelle conformation sert de point de départ pour le prochain déplacement aléatoire des atomes et la génération d'une nouvelle configuration. Les simulations moléculaires utilisant la méthode Monte Carlo ont permis de mettre en évidence l'effet additif des interactions électrostatiques et des liaisons de van der Waals sur les orientations préférentielles des protéines en interaction (*Persson et al. 2009*). Ces auteurs ont également modélisé le phénomène de régulation de charge lors de l'interaction de deux protéines de charge opposées en utilisant un modèle purement électrostatique (*Lund and Jönsson 2005*). L'effet de la répartition des régions hydrophobes à la surface d'une protéine sur son interaction avec un polymère non chargé a également été modélisé (*Jonsson et al. 2003*). L'interaction est favorisée lorsque les régions hydrophobes présentes à la surface de la protéine sont réparties d'une manière hétérogène.

La simulation moléculaire peut également être utilisée pour expliquer des résultats expérimentaux. A titre d'exemple, la simulation Monte Carlo des interactions entre la β -lactoglobuline ou l' α -lactalbumine avec un polyanion (modélisant la gomme arabique qui est un polysaccharide anionique faiblement chargé) a mis en évidence l'influence de la répartition des charges à la surface des protéines sur la stabilité des coacervats observés expérimentalement (*de Vries 2004*). Cet auteur a montré que le complexe formé par interaction de ce polyanion avec l' α -lactalbumine est plus stable que celui formé avec la β -lactoglobuline car le polyanion interagit au niveau d'un large patch positif et unique à la surface de l' α -lactalbumine alors que sa fixation est plus diffuse à la surface de la β -lactoglobuline comportant plusieurs petits patches chargés positivement. Un complexe est donc plus stable quand la répartition des charges et des régions hydrophobes est hétérogène, formant des patches contigus à la surface des protéines.

Ces approches de simulation moléculaires sont généralement utilisées en parallèle d'études expérimentales car elles ne permettent pas à elles seules de comprendre des interactions protéine-protéine. En effet, la disponibilité de la structure cristallographique d'une protéine et la description de sa surface ne sont pas suffisantes pour prédire avec précision les interactions protéine-protéine. D'autres paramètres entrent en jeu, tels que la flexibilité des protéines due à la dynamique des chaînes latérales et principales, ainsi que des changements conformationnels localisés ou étendus. De plus, des effets allostériques peuvent apparaître pendant l'interaction, les associations protéiques provoquant des réarrangements structuraux de résidus qui ne sont pas nécessairement impliqués dans l'interface.

3. Des interactions protéine-protéine à l'assemblage en objets supramoléculaires

Les interactions protéine-protéine peuvent mener à la formation de dimères, d'oligomères solubles mais aussi à la formation d'objets supramoléculaires (plusieurs microns) par assemblage. La taille et la morphologie de ces objets dépendent de la conformation des protéines et des conditions physico-chimiques du milieu.

3.1. Agrégation vs assemblage

L'agrégation des protéines est une réaction d'auto-association qui mène à la formation d'agrégats amorphes et floculants, avec une structure hétérogène et inactive biologiquement (*Fink 1998*). Des liaisons non covalentes et covalentes peuvent être impliquées. L'agrégation est réversible lorsqu'elle concerne la protéine native qui précipite sous certaines conditions lorsque sa limite de solubilité est dépassée (salting out) ou lorsque sa charge nette est nulle à son point isoélectrique. Dans ce cas, la conformation de la protéine est conservée dans les agrégats. L'agrégation native est un phénomène utilisé lors de la cristallisation des protéines. L'agrégation est généralement irréversible lorsqu'elle résulte d'interactions hydrophobes intermoléculaires entre protéines mal repliées ou partiellement dénaturées. Diverses conformations de protéines peuvent alors être retrouvées dans ces agrégats. La population d'états partiellement dépliés, soit par mutation de la chaîne polypeptidique, soit par modification de l'environnement physico-chimique, favorise donc l'agrégation. D'un point de vue industriel, l'agrégation des protéines est un phénomène important à maîtriser lors des procédés de fabrication en industrie alimentaire et pour la conservation de vaccins dans l'industrie pharmaceutique.

L'auto-assemblage des protéines se distingue de l'agrégation du fait de la formation spontanée d'objets ordonnés (*van der Linden and Venema 2007*). L'auto-assemblage de protéines vise un état minimal d'énergie par établissement de liaisons non covalentes telles que liaison hydrogènes, interactions électrostatiques et hydrophobes et de van der Waals. Bien que ces interactions soient de faibles amplitudes, leur grand nombre dans l'objet final augmente significativement sa stabilité. L'assemblage de protéines globulaires nécessite

généralement des modifications de conformation et/ou la formation d'oligomères particuliers (*Chiti and Dobson 2006*). Des conditions douces de dénaturation conduisent à la déstabilisation partielle de la protéine et sont donc favorables à la formation d'objets supramoléculaires par des protéines globulaires qui ne présentent pas de propriétés intrinsèques d'assemblage dans des conditions natives. L'auto-assemblage des protéines dépend donc de la balance entre forces attractives et répulsives et de ce fait est extrêmement dépendant des conditions physico-chimiques du milieu telles que le pH, la force ionique, la température.

3.2. Assemblages protéiques en biologie

L'auto-assemblage est une caractéristique fondamentale des systèmes biologiques puisqu'ils sont capables d'atteindre un état fonctionnel sans l'apport de forces autres que celles inhérentes aux molécules les composants.

De nombreuses fonctions biologiques impliquent la formation de complexes protéiques résultant d'interactions protéine-protéine, telle que la régulation des voies métaboliques qui est gouvernée par de nombreux complexes protéiques ou le système immunitaire qui met en jeu des complexes protéiques spécifiques antigène-anticorps.

L'auto-assemblage des protéines en objets supramoléculaires peut impliquer des chaînes polypeptidiques identiques, on parle d'homo-oligomérisation, ou différentes dans le cas d'hétéro-oligomérisation. Certaines associations sont permanentes alors que certains complexes sont dits transitoires parce qu'ils se forment et se dissocient continuellement. Nous allons présenter quelques exemples d'auto-assemblage biologiques pour illustrer cette variété.

3.2.1. Le virus de la mosaïque du tabac

Le concept d'auto-assemblage des protéines en objets supramoléculaires est apparu lors des études structurales du virus de la mosaïque du Tabac (TMV). Les travaux réalisés par Fraenkelconrat et Williams ont montré en 1955 que ce virus infectieux pouvait être reconstitué à partir de protéines et d'ARN dissociés (*Fraenkelconrat and Williams 1955*). Ce virus est une particule cylindrique, qui a la forme d'un bâtonnet (Figure I-11A). Sa structure cristallographique a été élucidée en 1986 par Namba et Stubbs à une résolution de 3.5 Å (*Namba and Stubbs 1986*). La capside est formée de 2130 capsomères, chaque capsomère étant formé d'un seul type de protéine, constituée de 158 acides aminés (4 hélices α et une boucle flexible). L'ARN monocaténaire est enroulé en hélice à l'intérieur de cette capside (Figure I-11B) et initie l'assemblage des capsomères.

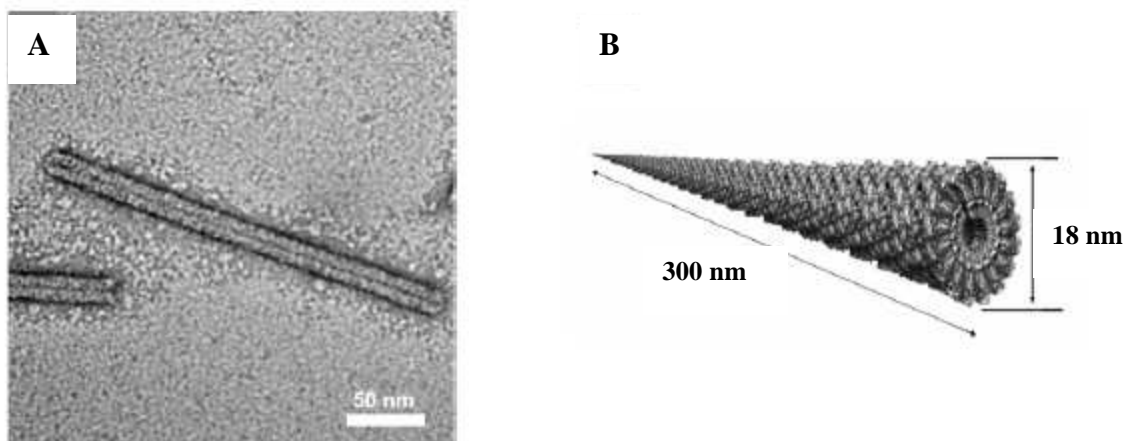


Figure I-11 : Observation au microscope électronique à transmission du virus de la mosaïque du tabac (A) et représentation schématique de sa structure enroulée en hélice autour du brin d'ARN (B). (*Li et al. 2008*)

3.2.2. Les microtubules

La forme des cellules et leur mobilité sont régies par l'état de structuration du cytosquelette, composé de filaments d'actine (*Carlier et al. 2003*) et de microtubules (*Conde and Caceres 2009*). Les microtubules sont des assemblages supramoléculaires non covalents qui sont capables de se former et de se désassembler au cours du cycle cellulaire (Figure I-12). Cet équilibre est régulé par l'interaction des microtubules avec des facteurs (GTP/GDP) promouvant leur assemblage ou leur déstabilisation. Ce sont des polymères tubulaires polarisés composés de protofilaments dont l'unité de base est l'hétérodimère de tubulines α et β (*Carlier et al. 2003; Conde and Caceres 2009*). L'interaction des microtubules avec les filaments d'actine leur confère leurs propriétés dynamiques d'orientation et de polarisation des neurones.

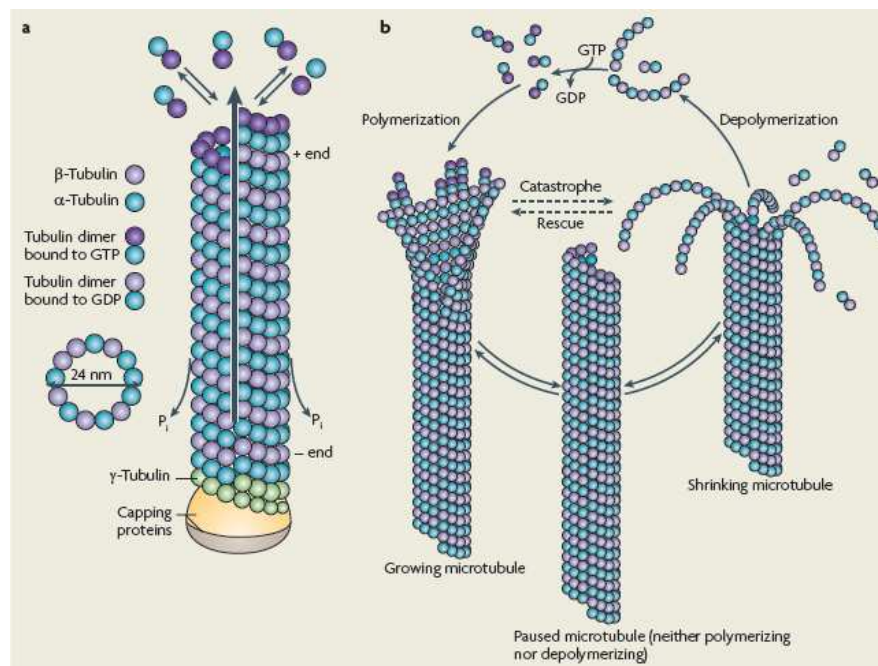


Figure I-12 : Structure et mécanisme d'assemblage-désassemblage des microtubules. Les hétérodimères de tubulines α et β s'assemblent par fixation du GTP. (*Conde and Caceres 2009*)

3.2.3. Le collagène

L'organisation des cellules en tissus biologiques met également en jeu des interactions entre protéines fibrillaires structurales, telles que l'élastine et le collagène. Le collagène est un assemblage protéique hélicoïdal qui confère aux tissus une résistance mécanique à l'étirement (*Friess 1998*). L'unité de base des fibres de collagène est le tropocollagène constitué de trois glycoprotéines (forte proportion de glycine, proline et hydroxyproline) (Figure I-13A) enroulées en hélice droite stabilisée par des liaisons hydrogènes. Les molécules de tropocollagène s'assemblent en une fibrille de 50 nm de diamètre (Figure I-13B) et sont maintenues par des liaisons covalentes entre lysines terminales. Ces fibrilles s'agrègent en une fibrille d'ordre supérieur de 500 nm de diamètre, qui s'associe avec d'autres fibrilles (Figure I-13C) pour former une fibre de collagène de 1 à 10 µm de diamètre.

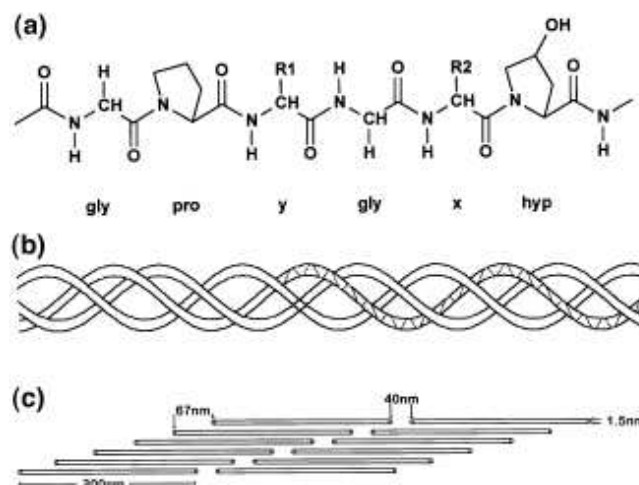


Figure I-13 : Niveau de structuration des fibres de collagènes : (a) séquence en acide aminé qui s'organise en hélice α gauche (tropocollagène), (b) trois molécules de tropocollagène sont enroulées en fibrille (hélice α droite) et (c) fibre de collagène par association de fibrilles. (*Friess 1998*)

3.2.4. Les fibres amyloïdes

Ce dernier exemple illustre un assemblage biologique qui ne présente pas de propriété fonctionnelle mais qui au contraire génère des dérèglements cellulaires. L'agrégation non contrôlée de protéines mal repliées peut conduire à la formation de dépôts de fibres amyloïdes, comme illustré sur le schéma ci-dessous proposé par Dobson (Figure I-14). Ces dépôts ont été détectés dans les cellules de divers organes et sont impliqués dans des maladies neurodégénératives, telles que la maladie d'Alzheimer, le maladie de Parkinson et la maladie du Creutzfeld-Jacob (*Dobson 2003*). Du fait de leur importante implication biologique la formation des fibres amyloïdes est étudiée d'une façon intensive.

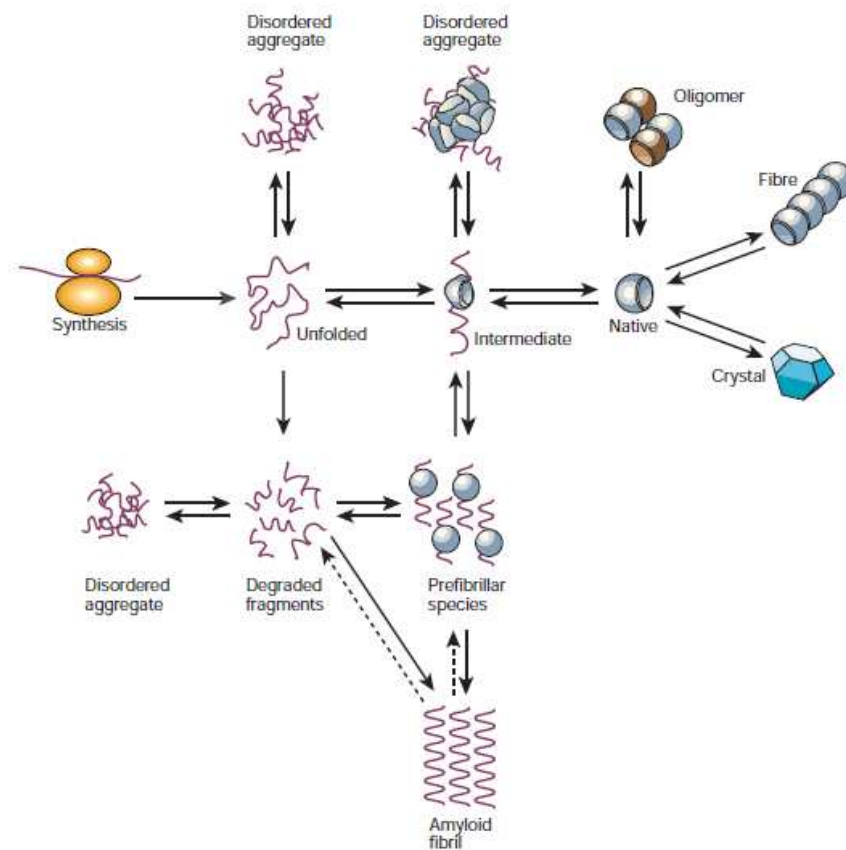


Figure I-14 : Modèle de formation de fibres amyloïdes à partir d'intermédiaires de repliement. Après sa synthèse par les ribosomes, la chaîne polypeptidique se replie et peut former des oligomères, des fibres ou des cristaux lorsqu'elle est dans sa conformation native. Inversement, des intermédiaires de repliement peuvent former des agrégats désordonnés ou être impliqués dans la formation d'espèces pré-fibrillaires qui sont converties en fibres amyloïdes matures par formation de feuillet β intermoléculaires. (*Dobson 2003*)

Une fibre amyloïde est un assemblage supramoléculaire linéaire non branché. Ces fibres ont un diamètre d'environ 10 nm et leur longueur peut atteindre plusieurs micromètres. La caractéristique structurale d'une fibre amyloïde est la structure « cross-béta » composée de feuillets β intermoléculaires orientés perpendiculairement à l'axe de la fibre (Figure I-15). Ces feuillets sont stabilisés par de nombreuses liaisons hydrogènes orientées dans l'axe de la fibre qui leur confèrent une grande stabilité. Une fibre résulte généralement de l'enroulement de plusieurs fibrilles. Cette organisation semi-cristalline en feuillets β croisés résulte en un profil de diffraction aux rayons X particulier, composé d'une bande méridionale à 4,7 Å correspondante à l'espace inter-brin, et d'une bande équatoriale plus diffuse aux environs de 10 Å correspondant à l'espace entre feuillets β . Ces objets sont également caractérisés par spectroscopie infrarouge par la présence d'une composante propre aux feuillets β non natifs (*Zandomenighi et al. 2004*), un déplacement du spectre d'émission de fluorescence de la thioflavine (*Krebs et al. 2005*) et une biréfringence verte du rouge congo (*Nilsson 2004*).

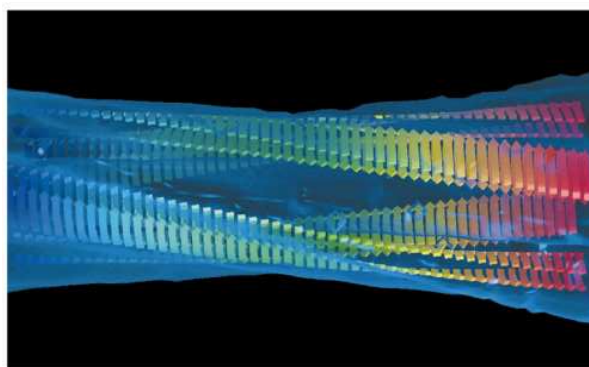


Figure I-15 : Modèle moléculaire d'une fibre amyloïde constituée de fibrilles enroulées, composées de protéines assemblées par des feuillets β intermoléculaires. (*Dobson 1999*)

La propension à former des fibres amyloïdes apparaît comme une propriété générale des chaînes polypeptidiques. En effet, il a été suggéré que toutes les protéines peuvent fibriller (*Fink 1998; MacPhee and Dobson 2000*), indépendamment de leur structure native, et peuvent adopter le motif particulier en feuillets β croisés. Le dépliement partiel de la structure native est un facteur crucial dans sa conversion en structures amyloïdes (*Kelly 1998; Uversky and Fink 2004*).

3.3. Auto-assemblage pour le développement de nouveaux biomatériaux

En s'inspirant des procédés par lesquels les objets supramoléculaires sont formés en biologie, de nombreuses études visent à utiliser les propriétés des biopolymères à former spontanément des structures ordonnées pour le développement de nouveaux biomatériaux. L'approche « bottom-up » consiste à fabriquer des objets par l'auto-assemblage d'unités élémentaires d'une manière contrôlée et utilise deux éléments clé de l'auto-assemblage: la complémentarité de forme des unités élémentaires et les interactions faibles et non covalentes (*Zhang et al. 2002; Sanguansri and Augustin 2006; Gazit 2007*).

A titre d'exemple, les protéines de soie d'araignée ont été étudiées pour comprendre les propriétés étonnantes d'élasticité et de résistivité de ces objets biologiques. Les soies d'araignées sont formées in vivo par l'auto-assemblage de protéines intrinsèquement dépliées de *Araneus diadematus*, majoritairement ADF3 et ADF4 (*Spiess et al. 2010*). Les propriétés particulières des soies d'araignée résultent de l'organisation de ces deux protéines en structures cristallines dans une matrice amorphe, responsables respectivement de la résistivité et de l'élasticité des soies. Les études réalisées in vitro avec des protéines recombinantes mimant ces protéines naturelles (eADF3 et eADF4) ont montré que, selon les conditions physico-chimiques employées, leur assemblage résultait en la formation d'une grande variété de biomatériaux de morphologies différentes, telles que des fils, des fibres, des microsphères, des capsules ou encore des hydrogels (*Hardy et al. 2008*). Nous en présenterons quelques exemples dans cette partie.

Un des aspects importants pour le développement de nouveaux biomatériaux est la compréhension des facteurs spécifiques qui régissent le mécanisme d'assemblage afin de fabriquer ces objets ordonnés d'une manière contrôlée.

Une alternative largement utilisée pour faciliter cette approche est l'utilisation de polymères synthétiques qui permet de contrôler la composition et la morphologie des objets. Les avancées biotechnologiques et en chimie de synthèse offrent de nombreuses possibilités pour le développement de polymères protéiques synthétiques, tels que des peptides présentant des motifs structuraux particuliers ou des propriétés de surfactant (composés de régions hydrophiles en alternance avec des régions hydrophobes) ou encore des polymères branchés. Ainsi des nanomatériaux de différentes morphologies ont été fabriqués, tels que des nanofibres, des nanotubes, ou encore des vésicules compartimentées (*Zhang et al. 2002;*

Zhang 2003; Gazit 2007; Yan and Pochan 2010). Ces matériaux présentent un large potentiel d'application dans des domaines aussi variés que la médecine, l'agroalimentaire ou encore la biotechnologie. Le dernier paragraphe de cette partie est dédié à la description de quelques exemples d'application.

Cependant, l'utilisation de biopolymères naturels tels que les protéines, les polysaccharides ou les lipides, plutôt que des polymères synthétiques, est de plus en plus recherchée du fait de leurs biocompatibilité et biodégradabilité. Ceci est un avantage certain lorsque les nouveaux objets formés présentent des applications potentielles pour les industries alimentaires ou pharmaceutiques. En effet, l'utilisation de nouveaux ingrédients fonctionnels nécessite une législation particulière et ce processus, généralement très long, est facilité lorsque les molécules utilisées sont déjà reconnues comme sans danger à la consommation (GRAS pour Generally Recognized As Safe). C'est pourquoi, les recherches actuelles pour la fabrication de nouveaux ingrédients fonctionnels tendent à préférentiellement utiliser des biomolécules existantes. L'utilisation de polymères alimentaires pour le développement de nouveaux matériaux présente également un avantage économique du fait de la valorisation des coproduits issus de la transformation de matières agricoles en produits alimentaires. Par exemple, les protéines du lactosérum sont des coproduits de l'industrie fromagère. Le lactosérum est produit en quantité équivalente à la quantité de lait utilisé pour fabriquer les fromages. De ce fait, les protéines solubles du lait sont des matières premières largement disponibles, peu chères, naturelles et généralement reconnues comme sans danger pour l'alimentation. Les protéines alimentaires ont en général une grande valeur nutritionnelle, de bonne qualité sensorielle et elles présentent de nombreuses propriétés structurales et fonctionnelles qui en font de très bons candidats pour le développement de matériaux protéiques (*Livney 2010*).

La morphologie des objets formés par assemblage de protéines peut être modulée en appliquant les principes de physico-chimie. Nous allons montrer au travers d'exemples variés que les principaux facteurs influençant leur formation sont la concentration en protéine, le pH, la force ionique, la température et la nature du solvant. En effet les variations de ces paramètres modifient la balance des forces gouvernant l'assemblage. Nous nous intéresserons tout d'abord aux objets formés par auto-assemblage d'une même protéine avant de présenter des systèmes plus complexes mettant en jeu au moins deux biopolymères. Enfin nous présenterons les applications potentielles de ces objets supramoléculaires pour les nanotechnologies, les biotechnologies et les industries alimentaire et pharmaceutique.

3.3.1. Systèmes mono-protéiques

Dans le cas de systèmes mono-protéiques, nous allons voir que des structures linéaires sont formées lorsqu'il y a des fortes répulsions électrostatiques, soit à un pH éloigné du pI et à faible force ionique (*van der Linden and Venema 2007*). Inversement, des particules sphériques sont formées dans des conditions où les répulsions électrostatiques sont faibles, soit à pH proche du pI et/ou à forte force ionique. Le dépliement partiel de l'état natif est généralement nécessaire bien que l'oligomérisation de l'état natif de la protéine peut également avoir lieu avant qu'apparaissent des modifications conformationnelles (*Chiti and Dobson 2006*).

3.3.1.1 Assemblages linéaires

La formation de fibres amyloïdes a été étudiée in vitro d'une façon intensive pour comprendre leur mécanisme d'assemblage et tenter d'apporter des éléments fondamentaux nécessaires à la création de traitements curatifs pour les maladies impliquant ce type d'assemblage.

Bien que de nombreuses protéines soient capables de fibriller, l'amplitude du réarrangement conformationnel nécessaire à la fibrillation, la morphologie des fibres (degré d'enroulement, leur longueur et leur rigidité) et leur stabilité dépendent de la protéine et des conditions expérimentales. En général un traitement thermique est combiné à l'abaissement du pH pour favoriser le dépliement partiel de la protéine.

L'équipe de van der Linden a étudié les fibres formées à partir de β -lactoglobuline, de la sérum albumine bovine et de l'ovalbumine à pH 2 par incubation à 60-80°C (*Sagis et al. 2004*). Les fibres formées par la β -lactoglobuline sont longues de plusieurs micromètres alors que celles formées par la sérum albumine bovine ou l'ovalbumine sont beaucoup plus petites (~200 nm) (Figure I-16A et B). Dans le cas de la sérum albumine bovine, les fibres sont réversibles et se désorganisent lorsqu'elles sont diluées en dessous de la concentration critique pour leur formation (*Veerman et al. 2003*). Les liaisons entre les monomères sont apparemment purement physiques. Dans le cas de la β -lactoglobuline et de l'ovalbumine, les fibres sont stables à la dilution (*Veerman et al. 2003*). L'assemblage est irréversible et les

fibres semblent être stabilisées par des changements conformationnels ayant lieu après l'assemblage de protéines natives.

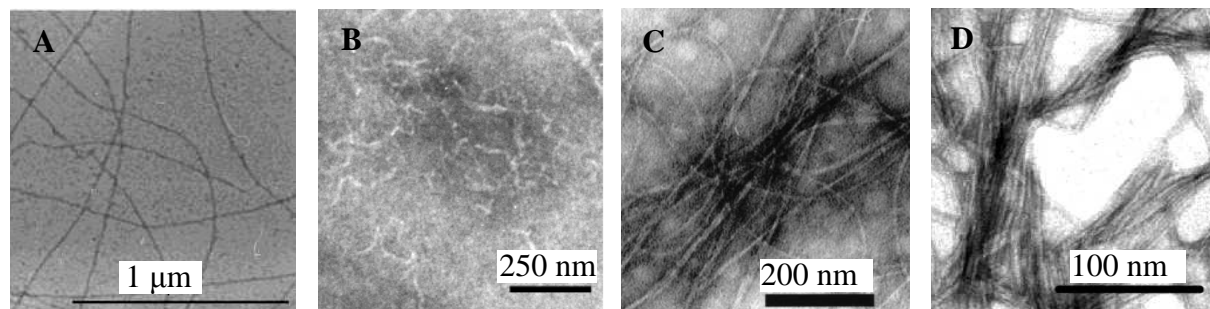


Figure I-16 : Observations au microscope électronique à transmission de fibres amyloïdes formées à pH 2 par (A) la β -lactoglobuline (80°C, 10h), (B) l'albumine de sérum bovin (60°C, 10h) (*Sagis et al. 2004*), (C) le lysozyme de poule (37°C, 56 j) (*Krebs et al. 2000*) et (D) l' α -lactalbumine (37°C, 4 j) (*Goers et al. 2002*).

Les protéines globulaires de la famille du lysozyme sont également capables de fibriller dans diverses conditions physico-chimiques (*Trexler and Nilsson 2007*). Le lysozyme de poule forme des fibres amyloïdes (Figure I-16C) par incubation prolongée dans une solution acide (pH 2.0-4.0) à température élevée (37-65°C) (*Krebs et al. 2000*). La formation de fibres a également été observée à pH 7.5 et à température ambiante lorsque la protéine est partiellement réduite et incubée dans de l'éthanol concentré en présence de NaCl (*Goda et al. 2000; Holley et al. 2008*). L'hydrophobie du solvant déstabilise partiellement la structure native de la protéine et la présence de sel favorise son agrégation. Des fibres amyloïdes sont également formées par l' α -lactalbumine (Figure I-16D) lors que celle-ci est incubée à 37°C à pH 2 où elle adopte une conformation partiellement dépliée, appelé état globule fondu ou « molten globule » (*Goers et al. 2002*). Ces auteurs ont également mis en évidence que la réduction de trois de ses quatre ponts disulfures accélérât la fibrillation alors que la présence de ligand, tels que Zn^{2+} favorisait la formation d'agrégats amorphes.

Ces études *in vitro* ont également permis d'établir le mécanisme de fibrillation.

L'activation de la protéine par déstabilisation partielle (abaissement du pH et augmentation de la température) et la nucléation sont les étapes limitantes du mécanisme. La phase de nucléation correspond à la formation d'agrégats amorphes non amyloïdes par agrégation des protéines partiellement dépliées. Cette agrégation est suivie d'un réarrangement structural des protéines.

En effet, la formation de feuillets β non natifs a été mise en évidence par spectroscopie infrarouge (Figure I-17), par exemple lors de la fibrillation de l' α -lactalbumine (*Goers et al. 2002*). Des études par hydrolyse partielle suivie par spectrométrie de masse ont également permis de déterminer les régions des protéines impliquées dans la fibrillation. Frare et coll. ont montré que le domaine β et l'hélice C du lysozyme participaient à la formation des feuillets β intermoléculaires (*Frare et al. 2004; Frare et al. 2006*). D'autre part, Polverino et coll. ont montré que les feuillets β n'étaient pas indispensables à la formation de fibres par l' α -lactalbumine puisque leur déplétion accélère la fibrillation (*Polverino de Laureto et al. 2005*). Ces auteurs proposent que la formation de feuillets β intermoléculaires résulte de la conversion d'hélices α .

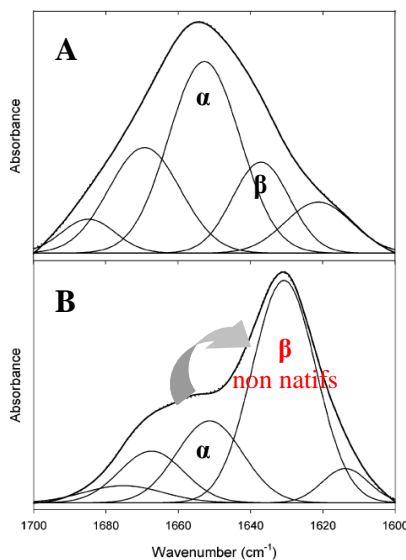


Figure I-17 : Spectres infrarouge d' α -lactalbumine à pH 2 en solution (A) et sous forme de fibres après incubation sur la nuit à 37°C (B). La comparaison des spectres met clairement en évidence la conversion d'hélice α en feuillets β non natifs (l'absorbance est maximale à un nombre d'onde inférieur à celui observé pour les feuillets natifs). (*Goers et al. 2002*).

Lorsque les interactions intermoléculaires sont suffisamment stabilisatrices pour compenser la diminution d'entropie conformationnelle des protéines, un état métastable non fibrillaire avec une apparence sphérique (2-5 nm de diamètre), appelé protofibrille, est formé (*Plakoutsi et al. 2005*). La phase de croissance mène à la formation de fibres par fixation de protéines monomériques sur les protofibrilles. Dans un premier temps, la liaison d'un monomère à une fibre est réversible. Les fibres sont « immatures » et peuvent être resolubilisées par abaissement de la température. Ce sont les changements conformationnels, c'est-à-dire la formation de feuillets β intermoléculaires, qui rendent la liaison irréversible et forment des fibres « matures » stables.

L'influence de l'agitation sur la cinétique de formation des fibres a été étudié par Bromley et Krebs (**Bromley et al. 2005**) dans le cas de la β -lactoglobuline. L'application d'une force de cisaillement accélère la fibrillation et permet de moduler la taille des fibres. En effet, la fragmentation des fibres « immatures » au niveau des monomères liés réversiblement permet de multiplier les noyaux et de favoriser les rencontres entre monomères. Ces auteurs proposent également que l'élongation des fibres soit stoppée du fait de l'hydrolyse des monomères après une incubation prolongée à température élevée et désactivation des extrémités (par conversion structurale ou hydrolyse partielle du monomère terminal).

Les exemples précédents concernent des protéines entières partiellement dépliées mais il a également été mis en évidence que l'hydrolyse partielle de la protéine favorise également sa fibrillation par l'exposition en surface de groupements hydrophobes. Otte et coll. ont étudié la formation d'objets linéaires par l' α -lactalbumine partiellement hydrolysée par la protéase de *Bacillus licheniformis* (BLP). L'ajout de calcium permet de moduler la forme des objets linéaires formés (Figure I-18B): en absence de Ca^{2+} , les monomères obtenus (fragment de 8.8 kDa) forment des fibres amyloïdes à pH neutre par incubation et 50°C, alors qu'en présence de Ca^{2+} des fragments de 11 kDa forment des nanotubes (Figure I-18A). Ces assemblages linéaires tubulaires (diamètre interne de 8 nm) sont formés spécifiquement par l'établissement de ponts salins entre le calcium et des groupements carboxyliques de la protéine (**Graveland-Bikker et al. 2004; Graveland-Bikker and de Kruif 2006; Graveland-Bikker et al. 2006; Ipsen and Otte 2007**).

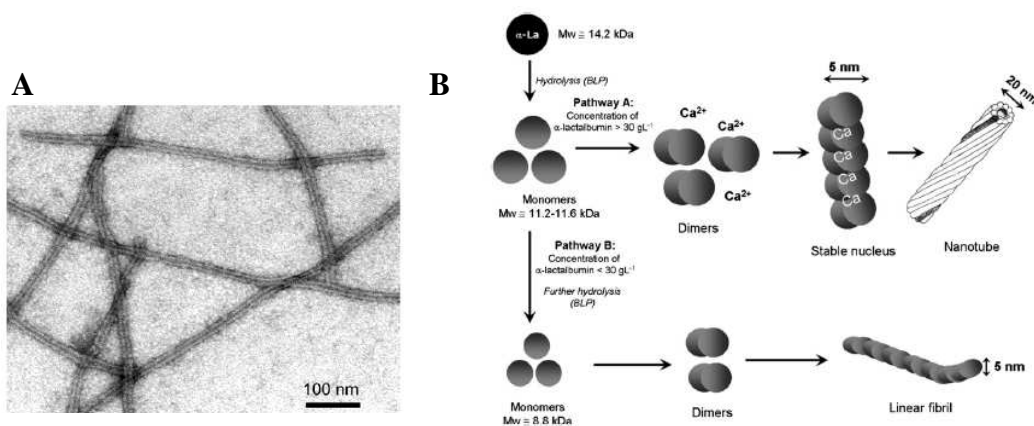


Figure I-18 : A : Nanotubes d' α -lactalbumine (microscopie électronique à transmission) (**Graveland-Bikker et al. 2004**). **B :** Mécanisme d'assemblage de l' α -lactalbumine partiellement hydrolysée par la protéase de *Bacillus licheniformis* (BLP) à pH 7.5 et 50°C. En présence de calcium les fragments de 11 kDa forment des nanotubes et en absence de calcium les fragments de 8 kDa forment des fibres amyloïdes. (**Ipsen and Otte 2007**)

En définitive, la formation d'assemblages linéaires, tels que les fibres amyloïdes, est favorisée dans des conditions où les protéines présentent un excès de charges et sont partiellement dénaturées. L'apparence d'ordre dans ces objets est favorisée d'une part par des répulsions électrostatiques et d'autre part la réorganisation structurale en feuillets β intermoléculaires qui imposent une direction privilégiée de croissance.

3.3.1.2 Assemblages sphériques

Les protéines globulaires peuvent également être utilisées pour la formation de structures sphériques.

Krebs et coll. ont montré que la formation de structures particulières est une propriété commune à toutes les protéines globulaires lorsque celles-ci sont incubées à température élevée et à un pH proche ou égale à leur pI. En effet, ils ont mis en évidence la formation de gel particulières constitués de particules sphériques monodisperses (Figure I-19) à partir de protéines variées telles que la β -lactoglobuline, la sérum albumine bovine, l'insuline bovine, la myoglobine, le lysozyme de poule, l' α -synucléine et la transthyrétine humaine (**Krebs et al. 2007**). Ces protéines se différencient par leur pI, leur poids moléculaire et par leur contenu en hélice α ou feuillet β . Les particules sphériques sont obtenues à partir de solutions protéiques concentrées (30 g.L^{-1}) incubées à 90°C en présence de 100 mM NaCl à un pH proche du pI de chaque protéine. Dans ces conditions les protéines sont partiellement dépliées et faiblement chargées. L'absence de répulsion électrostatique entraîne donc une agrégation rapide gouvernée par des interactions hydrophobes. La quantification des changements de structures secondaires par spectroscopie infrarouge des protéines assemblées révèle qu'une réorganisation structurale n'est pas systématique. Par conséquent, l'agrégation est non spécifique et il n'y a pas de direction privilégiée dans les agrégats résultant en la formation de particules sphériques. Ces mêmes protéines forment également des fibres amyloïdes lorsqu'elles sont incubées à température élevée à un pH éloigné de leur pI où elles sont fortement chargées. Les forces de répulsion sont fortes et provoquent une cinétique lente d'agrégation. Krebs et coll. assimilent ce comportement à celui des colloïdes/polymères : une agrégation rapide et isotrope est obtenue quand les charges sont partiellement écrantées, alors que la présence de charges entraîne une agrégation plus lente qui résulte en la formation de structure cristalline (**Lin et al. 1989**).

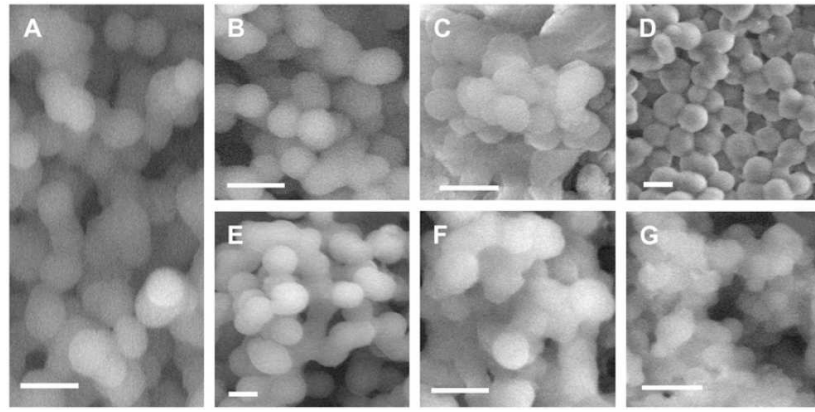


Figure I-19 : Particules sphériques formées par assemblage de la β -lactoglobuline (A), la sérum albumine bovine (B), l'insuline bovine (C), la myoglobine de cheval (D), le lysozyme de poule (E), la transthyretine humaine (F) et l' α -synucléine humaine (G), après incubation à 90°C en présence de 100 mM NaCl à un pH proche du pI de chaque protéine. La barre d'échelle est de 1 μ m. (Krebs *et al.* 2007)

La formation de particules sphériques par le lysozyme a également été mise en évidence à pH acide (Bohr *et al.* 1997). Ces auteurs ont étudié la précipitation du lysozyme et de la ribonucléase à pH 1.5 en fonction de la concentration en protéine et en chlorure de potassium. En présence d'une concentration élevée en sel, des structures branchées ont été obtenues à faible concentration en protéine alors que des structures sphériques ont été observées à des concentrations élevées en protéine. Deux mécanismes d'assemblage ont alors été proposés. Le mécanisme de croissance en masse (« bulk growth ») consiste en une agrégation par diminution de la solubilité après l'ajout de sel (salting out) suivie d'une croissance selon une symétrie sphérique à partir du point de nucléation. Le second mécanisme (« sheet growth ») suggère une agrégation des protéines en feuillets présentant une courbure qui provoque leur enroulement en enveloppes concentriques lors de la croissance. Dans les deux cas, les objets formés ont une apparence sphérique.

L'équipe de Scheibel et Slotta a quant à elle discuté l'influence de la force ionique sur le type d'agrégats formés. Ils ont mis en évidence la formation de microsphères à partir de protéines recombinantes de soie d'araignées eADF4 (pI 3.48) (Lammel *et al.* 2008). Ces objets sont formés à température ambiante et pH 8 en ajoutant du phosphate de potassium à des concentrations supérieures ou égales à 400 mM (Figure I-20A). La force d'agitation et la concentration en protéine permettent de moduler la taille des microsphères. Inversement, en ajoutant une concentration en phosphate de potassium inférieure à 300 mM, des nanofibres d'un diamètre compris entre 2 et 10 nm sont formées à partir de solution protéique diluée

(1 g/l). Ces auteurs ont également mis en évidence la formation de feuillets β non natifs dans les nanofibres mais aussi dans les microsphères. Ces observations les ont amenés à postuler que l'assemblage de cette protéine en objets de morphologies différentes suit un procédé structural similaire mais des cinétiques différentes (*Slotta et al. 2008*) (Figure I-20B). La première étape du mécanisme consiste en une agrégation des protéines induite par écrantage des charges négatives par le phosphate de potassium. Lorsque la concentration saline est faible, des noyaux structurés sont formés et restent en suspension dans la phase aqueuse puis ceux-ci grossissent par élongation pour former les nanofibres de type amyloïde. Dans le cas des microsphères, une séparation de phase est induite par altération des interactions protéine-solvant (salting out) et lorsque la concentration locale en protéine est supérieure à la concentration critique de nucléation, plusieurs noyaux structurés sont formés simultanément. Ceux-ci grossissent d'une façon sphérique en interagissant avec d'autres monomères et en convertissant leur structure en feuillets β .

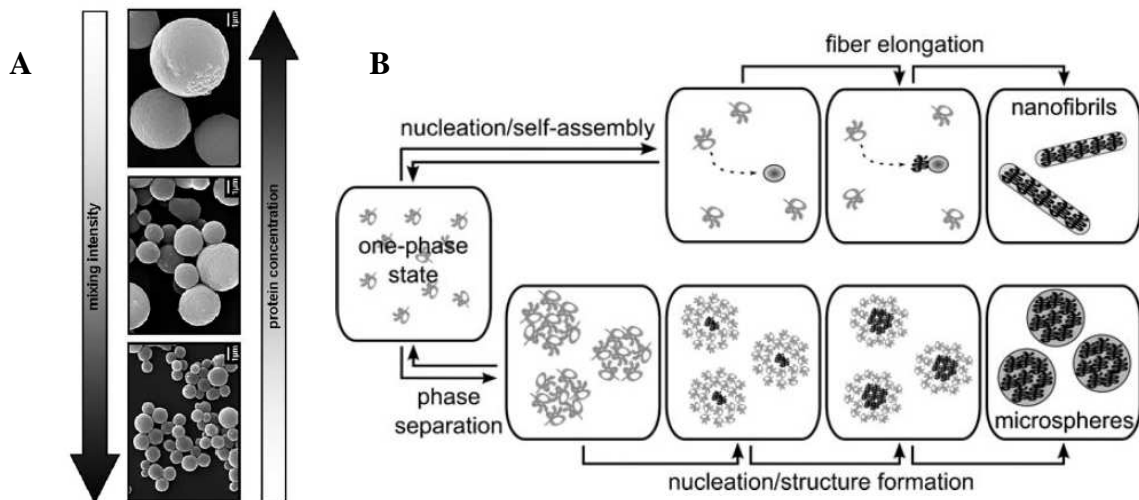


Figure I-20 : A : Microsphères formées par assemblage d'eADF4 à pH 8 en présence de 1 M de phosphate de potassium. La taille des objets augmente avec la concentration en protéine alors que leur nombre augmente avec l'intensité d'agitation. (*Lammel et al. 2008*) **B :** Mécanisme d'assemblage en fonction de la force ionique du milieu : à faible force ionique, les protéines s'assemblent en fibres selon un mécanisme de nucléation croissance alors qu'à force ionique élevée, des microsphères sont formées après séparation de phase et croissance sphérique des noyaux formés. (*Slotta et al. 2008*)

Un dernier exemple illustre un assemblage sphérique particulier, les sphérulites. Ces objets sphériques d'un diamètre compris entre 10-150 μm présentent une structure semi cristalline caractérisée par un profil de biréfringence en croix de malte (Figure I-21). Elles ont par exemple été obtenues par incubation prolongée d'insuline bovine à 65°C et de β -lactoglobuline à 80°C dans un tampon à pH 2 et de faible force ionique ($\text{NaCl} < 50\text{mM}$) (Sagis *et al.* 2002; Krebs *et al.* 2004; Bromley *et al.* 2005; Krebs *et al.* 2005). Ces auteurs ont montré que ces sphérulites sont composées d'un noyau amorphe (protéines agrégées) et de fibres amyloïdes organisées radialement.

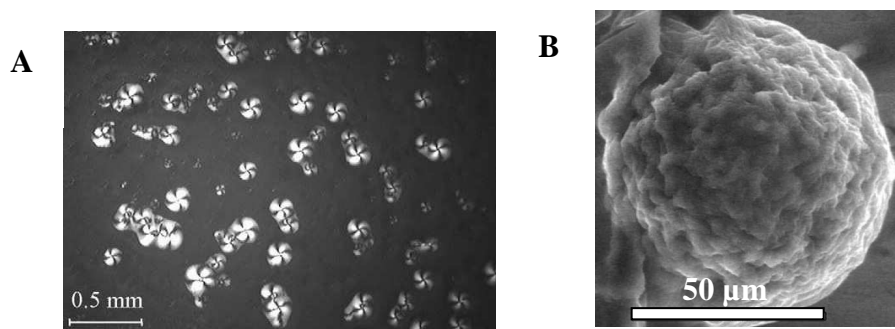


Figure I-21 : Sphérulites de β -lactoglobuline obtenues par incubation prolongée à pH 2 et 80°C. **A :** Profil de biréfringence en croix de malte observée sous lumière polarisée caractéristique d'une structure semi-cristalline. (Sagis *et al.* 2002) **B :** Observation par microscopie électronique à balayage. (Bromley *et al.* 2005)

En conclusion, des objets sphériques peuvent être formés lorsque les protéines sont faiblement chargées. Les conditions physico-chimiques favorables sont, par exemple, un pH proche de leur pI et des forces ioniques relativement élevées. Les sphérulites sont un exemple particulier puisque les conditions favorables à leur formation se rapprochent des conditions favorables à la formation de fibres amyloïdes. Comme pour la formation d'objets linéaires, les assemblages sphériques nécessitent la dénaturation partielle la protéine. Cependant, l'organisation en une géométrie sphérique est favorable thermodynamiquement du fait de la minimisation de l'énergie de surface des particules par l'existence d'une tension de surface entre la solution et la phase condensée (Maresov and Semenov 2008).

Nous allons voir dans le chapitre suivant que ces objets (linéaires ou sphériques) peuvent s'organiser en un réseau tridimensionnel lorsque leur concentration dépasse une concentration critique.

3.3.1.3 Les hydrogels

Du fait d'un grand rapport de taille entre diamètre et longueur des fibres amyloïdes, une solution concentrée de fibres peut former des hydrogels (*Loveday et al. 2009*) par organisation tridimensionnelle de celles-ci. Les hydrogels sont des objets poreux qui présentent alors une structure fibrillaire et des propriétés rhéologiques intéressantes.

Miller et coll. ont mis en évidence la formation d'hydrogels transparents, viscoélastiques et thermoréversibles par le lysozyme (Figure I-22A) (*Yan et al. 2006*). La présence de feuilletts β intermoléculaires a été mise en évidence par spectroscopie infrarouge et l'observation par microscopie électronique montre l'organisation fibrillaire. Selon ces auteurs, une fois la fibrillation provoquée par augmentation de la température, au fur et à mesure que la température diminue, des fibres plus longues se forment et en dessous de la température de gélification, les fibres s'associent localement par des jonctions hydrophobes résultant en un réseau tri-dimensionnel de plus en plus dense (*Yan et al. 2008*).

Les gels fibrillaires sont généralement transparents. La Figure I-22B illustre les hydrogels formées par assemblage des nanofibres de protéines recombinantes de soie d'araignées (*Rammensee et al. 2006*). Ce type de gel est obtenu à faible force ionique et à un pH éloigné du pI où les répulsions électrostatiques sont maximales (*Yan and Pochan 2010*). Comme nous l'avons vu précédemment, ces conditions freinent la formation d'agrégats aléatoires en favorisant la formation d'agrégats linéaires. Au contraire plus la force ionique augmente et le pH s'approche du pI, plus le gel devient opaque à turbide. Du fait de faibles forces de répulsion, la protéine dénaturée s'agrège d'une façon aléatoire selon des interactions hydrophobes et des liaisons van der Waals. Ce type de gel peut être particulière comme illustré précédemment par les travaux de Krebs (Figure I-19).

Ces deux types de gels (transparents et opaques) ont par exemple été observés dans le cas de la β -lactoglobuline (*Bromley et al. 2005*) et du lysozyme (*Tani et al. 1993*). Les fibres de β -lactoglobuline peuvent également s'associer en hydrogels par ajout de CaCl_2 comme agent de gélification formant des ponts salins entre les fibres formées à pH 2 et 80°C (*Veerman et al. 2003*).

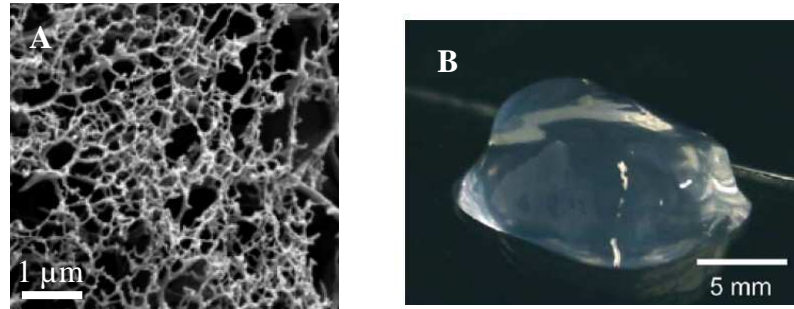


Figure I-22 : **A :** Hydrogel formé par organisation tridimensionnelle de fibres de lysozyme (microscopie électronique à balayage). (*Yan et al. 2006*) **B :** Hydrogel fibrillaire constitué de nanofibres de protéines recombinante de soie d'araignée (eADF4). (*Rammensee et al. 2006*)

Pour conclure, il est intéressant de noter qu'une même protéine peut former différents types d'objets selon les conditions physico-chimiques utilisées. La Figure I-23 illustre les objets formés par dénaturation thermique de la β -lactoglobuline:

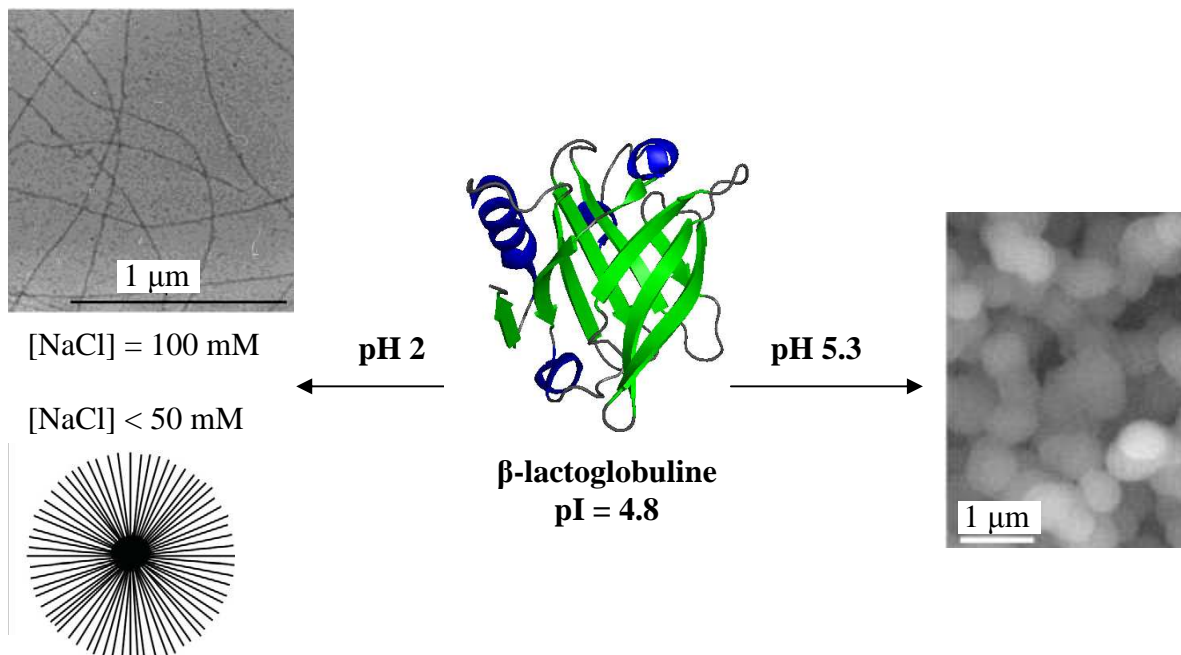


Figure I-23 : La dénaturation thermique de la β -lactoglobuline résulte en la formation de fibres à pH 2. Ces fibres s'organisent en gel à des concentrations élevées en protéine et NaCl ou en sphérulites à faible force ionique. Lorsque le pH de la solution est proche de son pI, cette protéine s'assemble en gel particulaire.

3.3.2. Systèmes binaires

Lorsque deux protéines sont en mélange, l'étude de l'influence des paramètres physico-chimiques sur la morphologie des objets supramoléculaires formés et les mécanismes d'assemblage se complexifient car les partenaires présentent des propriétés physico-chimiques différentes.

Le mélange de deux biopolymères en solution peut montrer différents comportements. Dans des conditions très diluées, les deux polymères coexistent en solution alors que le système devient instable lorsque les concentrations en polymères augmentent (*de Kruif and Tuinier 2001*). Deux cas se distinguent alors: la ségrégation des polymères en deux phases ou leur association. La première situation est rencontrée quand les polymères sont incompatibles thermodynamiquement, c'est-à-dire que les forces répulsives sont dominantes, et résulte en une séparation de phase. Dans le cas où les interactions sont principalement attractives, les deux polymères s'associent pour former des complexes. Comme nous allons le présenter dans les paragraphes suivants, l'organisation de chaque polymère au sein de ces complexes dépend de leur forme et taille respective ainsi que de la composition physico-chimique du milieu.

Les études visant à caractériser les assemblages impliquant deux protéines ne sont pas très nombreuses, c'est pourquoi nous présentons également des complexes formés par l'interaction de protéines avec des polysaccharides.

3.3.2.1 Protéine-polysaccharide

Les polysaccharides sont des polymères linéaires ou branchés. Contrairement aux protéines qui sont constituées de divers acides aminés, la composition en unité élémentaire (glucides) des polysaccharides est relativement homogène et leur conformation tridimensionnelle est limitée à une structure hélicoïdale (κ -carraghénane) ou une absence de structure définie (alginate, chitosane). Cependant, ils sont comparables aux protéines car ce sont des polyélectrolytes dont la flexibilité et la distribution en charge peuvent être modulées par les conditions physico-chimiques du milieu.

Les complexes protéine-polysaccharide sont communément appelés coacervats. Ce sont des complexes sphériques de 100 nm à 1 µm de diamètre dont la formation est principalement gouvernée par des interactions électrostatiques. Ils sont généralement obtenus par ajustement du pH. Lorsqu'un polysaccharide anionique (pectine) est utilisé, il est mélangé avec la protéine à un pH supérieur au pI de celle-ci, les deux polymères sont alors tous deux chargés négativement puis le pH est ajusté pour être proche ou inférieur au pI afin de provoquer la coacervation. Au contraire, lorsqu'un polysaccharide cationique (chitosane) est utilisé, les deux polymères sont mélangés à un pH inférieur au pI de la protéine puis le pH est ajusté à une valeur proche ou supérieure au pI. Les coacervats sont généralement neutres et une phase aqueuse a tendance à se séparer de la phase dense contenant les deux polymères (*Jones and McClements 2010*). Ils sont formés dans une gamme étroite de pH (autour du pI de la protéine) car ils précipitent si les attractions électrostatiques sont trop élevées. Le pH optimal dépend du rapport molaire protéine/polysaccharide qui gouverne le phénomène de neutralisation des charges. Il a également été démontré que la formation de coacervats est favorisée par une répartition hétérogène des charges à la surface de la protéine (*Turgeon et al. 2003*). A titre d'exemple, des coacervats de β -lactoglobuline et de gomme acacia résultent d'une séparation de phase par interactions électrostatiques fortes à pH 4.2, soit à un pH inférieur au pI de la protéine (*Schmitt et al. 2001*). Dans ces coacervats, des changements conformationnels de la protéine (perte d'hélices α) ont été mis en évidence mais ce n'est pas le cas dans tous les types de coacervats.

3.3.2.2 Systèmes à deux protéines

Le groupe de Lewis est un des premiers à mettre en évidence la formation d'une solution turbide par mélange de deux protéines globulaires de charges opposées ; le lysozyme et la β -lactoglobuline ou le lysozyme et l' α -lactalbumine qui co-précipitent à pH 6.8 (*Howell et al. 1995*). Ces auteurs ont démontré l'importance des interactions électrostatiques entre ces protéines natives puisque leur précipitation est réduite en augmentant la force ionique ou en variant le pH du milieu. Ils ont également mis en évidence l'implication d'interactions hydrophobes et la formation de liaisons hydrogènes dans la stabilisation des précipités (*Howell and LiChan 1996*).

Dans le cas d'un mélange binaire, l'importance des propriétés de surface des protéines pour leur interaction et leur assemblage en objets supramoléculaires a été rapportée par Biesheuvel lors de l'étude de l'assemblage du lysozyme natif avec son homologue modifié, le lysozyme succinylé. A pH neutre, ces deux protéines portent des charges globales opposées et leur conformation est supposée non affectée. Des résultats expérimentaux combinés à des études par simulation moléculaire, ont montré que l'assemblage de ces deux protéines était modulé par des facteurs physico-chimiques tels que le pH, la force ionique, la température et le rapport molaire de ces deux protéines (*Biesheuvel et al. 2006; Biesheuvel et al. 2006*). L'assemblage est défavorisé par augmentation de la force ionique et est inhibé à des pH où les deux protéines portent des charges globales de même signe. Ces auteurs ont également établi un diagramme de phase en fonction de la force ionique et de la concentration en protéine montrant que les conditions optimales pour la séparation de phase favorable à leur assemblage sont des concentrations protéiques élevées, une faible force ionique, une faible température, un rapport de charge symétrique et donc un pH où les charges sont les plus élevées, i.e. pH 7.5.

Mossa et coll. ont montré par modélisation que la balance entre attraction à courte distance et répulsion à longue distance (interactions électrostatiques et écrantage des charges) définissait le mécanisme d'auto-assemblage de protéines ainsi que la morphologie de l'objet supramoléculaire formé (*Mossa et al. 2004*). Quelque soit le système binaire considéré, la compensation des charges de surface semble prévaloir pour la formation de particules sphériques. Lorsque seules des forces attractives sont présentes, les clusters sont sphériques quelque soit leur taille, alors qu'en présence de force répulsives, seuls les clusters de petite taille restent sphériques et les plus gros deviennent linéaires.

Yu et coll. ont mis en évidence la formation de gels particuliers dans des systèmes bi-protéiques impliquant des protéines du blanc d'œuf. Le lysozyme et l'ovalbumine forment des particules d'environ 200 nm de diamètre qui sont composées d'un cœur de lysozyme et d'une enveloppe d'ovalbumine (*Yu et al. 2006*). Les protéines sont initialement mélangées à pH 5.3, pH situé entre le pI des protéines, où elles portent des charges opposées. Le pH est ensuite ajusté à pH 10.3 (proche du pI du lysozyme et supérieur à celui de l'ovalbumine) et la solution est incubée à 90°C pendant 90 min. Les molécules de lysozyme s'associent et le traitement thermique résulte en la formation de particules gélifiées, structurées en un cœur de lysozyme chargé positivement enveloppé d'une couche d'ovalbumine chargée négativement.

Ces particules sphériques gélifiées forment un nanogel. Des objets similaires sont formés par interactions électrostatiques et gélification de l'ovalbumine et de l'ovotransferrine à pH neutre, où une protéine est chargée négativement et l'autre est neutre (*Hu et al. 2007*). Il a également été montré, dans le cas du lysozyme en interaction avec la β -caséine (*Pan et al. 2007*), que la taille de ces particules et la répartition des protéines peuvent être modulées par ajustement du pH comme illustré par la Figure I-24.

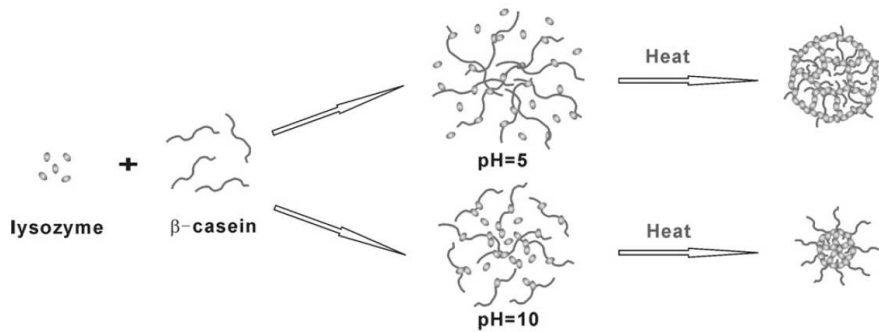


Figure I-24 : Modulation de l'organisation interne des nanogels formés par co-assemblage de lysozyme et de la β -caséine en fonction du pH. (*Pan et al. 2007*)

Cependant il est important de noter que ces nanogels ne sont pas formés spontanément après mélange des deux protéines car ils nécessitent l'application d'un traitement thermique relativement drastique. Dans cette étude, nous nous intéressons plus particulièrement aux objets formés par auto-assemblage dit « non induit » de deux protéines, c'est-à-dire ne nécessitant aucun apport d'énergie extérieure ou l'utilisation de conditions douces de dénaturation.

Récemment, des particules sphériques de quelques micromètres de diamètre ont été obtenues par mélange de deux protéines de charges opposées à faible force ionique et température ambiante (*Desfougères et al. 2010*). Les différents systèmes binaires étudiés impliquent une protéine acide (ovalbumine, pI 4.8 ou sérum albumine, pI 5) et une protéine basique (lysozyme, pI 10.5 ou avidine, pI 9.5). Quelque soit le système, ovalbumine-lysozyme, avidine-ovalbumine et sérum albumine-lysozyme, les microsphères sont formées sur une gamme de pH étroite où les protéines portent des charges opposées et les protéines co-localisent dans les objets formés. Cependant, selon le couple étudié, le pH optimal de formation des microsphères ainsi que la stœchiométrie des protéines assemblées varient. Ces paramètres dépendent des caractéristiques structurales des protéines, telles que leur charge

nette et leur taille. Ces auteurs mettent ainsi en évidence, qu'en plus de la compensation de charge, la compensation de taille moléculaire est nécessaire pour la formation optimale de microsphères. Si on considère le couple ovalbumine-lysozyme : le pH optimum de formation des microsphères est pH 8 et les microsphères contiennent deux fois plus de lysozyme que d'ovalbumine. Or à ce pH le lysozyme porte une charge nette de +7 et l'ovalbumine de -14 et l'ovalbumine présente une surface deux fois plus élevée que celle du lysozyme. La composition des microsphères et le pH optimal sont donc régis d'une part par une compensation de charge et d'autre part une compensation de la taille. Des particules sphériques peuvent donc être formées à partir de différents couples de protéines à condition d'ajuster les conditions physico-chimiques.

Dans le chapitre suivant nous présenterons en détail les microsphères obtenues par assemblage du lysozyme et de la forme décalcifiée de l' α -lactalbumine. Ce couple constitue notre système d'étude.

Des systèmes plus complexes comprenant plus de deux protéines ont également été étudiés. Des objets supramoléculaires, tels que des fibres, des sphérulites et des gels, ont été obtenus à partir d'un mélange de protéines du lactosérum incubé à pH 2 et 80°C. (**Bolder et al. 2006; Bolder et al. 2007**). Cependant la compréhension des forces gouvernant l'assemblage et l'implication d'une protéine en faveur d'une autre dans les objets formés est d'autant plus difficile que le système protéique est complexe.

3.3.3. Applications potentielles des assemblages protéiques

Dans ce paragraphe nous nous intéressons aux différentes applications possibles qui ont été envisagées pour ces objets supramoléculaires dans des domaines variés tels que les bio- et nano-technologies, l'agroalimentaire et la pharmaceutique. D'une manière générale, les propriétés et les performances fonctionnelles d'un objet dépendent de sa composition, de ses dimensions, forme et structure interne, de ses caractéristiques électrostatiques et physico-chimiques, ainsi que de sa stabilité (**Jones and McClements 2010**).

Du fait de leur grand rapport de taille, les objets linéaires peuvent être utilisés par l'industrie alimentaire pour augmenter la viscosité d'un produit ou comme agent de gélification. La formation d'hydrogels fibrillaires transparents, répondant d'une manière contrôlée aux variations de pH et de force ionique est une propriété avantageuse pour le développement d'ingrédients fonctionnels. Ainsi, ces objets peuvent être utilisés pour le transport et la libération de molécules dans des conditions physiologiques ciblées, en utilisant par exemple leur sensibilité au pH pour leur libération contrôlée dans le tractus digestif.

D'autre part, les propriétés d'assemblage des fibres en hydrogels présente également des applications en biotechnologie et ingénierie tissulaire (*Kasai et al. 2004*). En effet il a été montré que les gels fibrillaires peuvent être utilisés comme échafaudage à la croissance cellulaire car ceux-ci présentent de bonnes qualités d'adhérence cellulaire, comme rapporté dans le cas des hydrogels fibrillaires de lysozyme (*Yan et al. 2006*).

Les suspensions concentrées de protéines assemblées en fibres ou microsphères peuvent également être utilisées pour la formation de biofilms (Figure I-25) après évaporation du solvant (*Huemmerich et al. 2006*). Ces objets présentent alors des applications variées telles que l'enrobage biocompatible de systèmes médicaux ou la fonctionnalisation de surface pour la création de biosenseurs. En effet, ces films peuvent être modifiés (Figure I-26A) par liaison covalente de molécules. Un exemple a été rapporté pour la fonctionnalisation du film formé par la protéine eADF4 par liaison covalente de β -galactosidase (Figure I-26B) (*Huemmerich et al. 2006; Hardy et al. 2008*).



Figure I-25 : Biofilm formé par eADF4 (20 mg/ml dans de l'hexafluoroisopropanol : HFIP) après évaporation de HFIP. (*Huemmerich et al. 2006*)

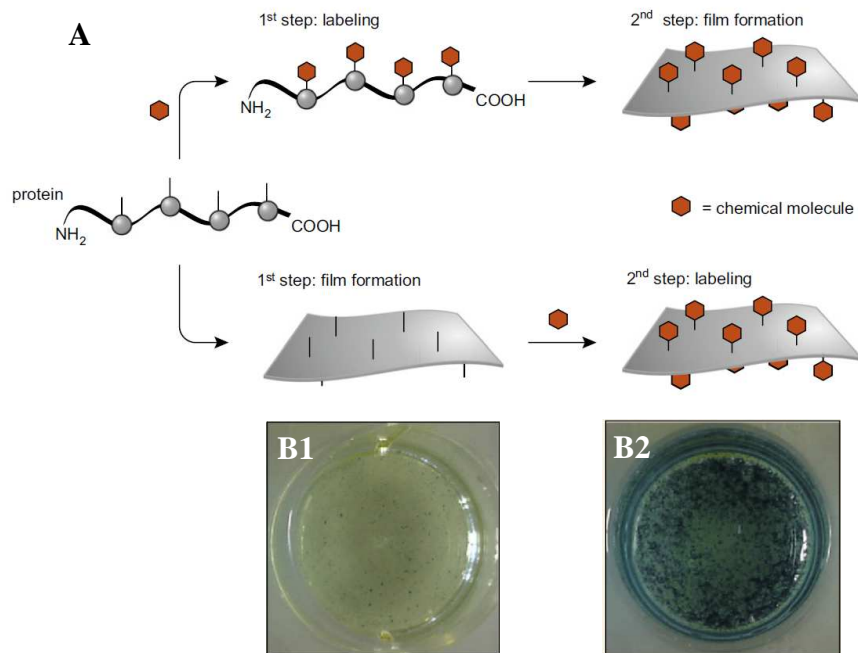


Figure I-26 : A : Méthodes pour la fonctionnalisation du biofilm formé par eADF4: la protéine est préalablement modifiée avec l'enzyme β -galactosidase avant la formation du film ou l'enzyme est greffée sur le film une fois celui-ci formé. Essais enzymatiques sur le film non modifié (**B1**) et le film modifié (**B2**) après ajout du substrat X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -galactopyranoside) transformé par la β -galactosidase en un produit indole de couleur bleu. (*Hardy et al. 2008*)

La modification de surface est également envisageable pour les fibres et les nanotubes. En effet il a été montré que des fibres formées de peptides synthétiques pouvaient être modifiées en attachant de façon covalente des molécules aux portions des protéines qui ne sont pas impliquées dans les feuillets β intermoléculaires (*Gazit 2007*). Ainsi ces objets linéaires peuvent être utilisés pour la fonctionnalisation de surface avec des applications nanotechnologiques, telles que l'impression de motifs protéiques sur des nanopuces, ou pour la création de biosenseurs par liaison covalente d'anticorps ou d'enzymes. Les équipes de Gazit et Scheibel ont également suggéré l'utilisation des fibres protéiques pour le développement de nanofils électriques ; les fragments protéiques ont été modifiés par addition de résidus cystéines dont les groupements thiols favorisent la fixation de nanoparticules de métaux conducteurs, tels que l'argent, l'or et le platine (*Scheibel et al. 2003; Kasotakis et al. 2009*).

L'utilisation de protéines pour l'encapsulation de molécules bioactives ou d'ingrédients fonctionnels est également très convoitée par les industries alimentaires et pharmaceutiques du fait de leur biocompatibilité et biodégradabilité.

Les nanotubes d' α -lactalbumine ont la particularité de présenter une cavité de 8 nm. Cette propriété leur confère des applications potentielles pour l'encapsulation de molécules bioactives, telles que des vitamines, des arômes ou des enzymes (**Graveland-Bikker et al. 2006**). Ces auteurs proposent d'ajouter une molécule lipidique à l'extrémité des nanotubes pour fermer ceux-ci et contrôler la libération de cette molécule bioactive en s'inspirant des résultats publiés sur la fonctionnalisation de microtubules par complexation avec des liposomes (**Raviv et al. 2005**).

Les protéines du lait ont été particulièrement étudiées pour leur propriétés physico-chimiques incluant la fixation d'ions et de petites molécules, leur propriété d'assemblage et de gélification (**Livney 2010**). Ces propriétés leur confèrent des potentiels applicatifs comme vecteur de molécules bioactives pour la distribution de molécules hydrophobes ou la fabrication de particules compartimentées après conjugaison à des polysaccharides par la réaction de Maillard. D'autre part, de nombreuses équipes de recherche ont focalisé leurs travaux sur les interactions protéine-polysaccharides car les coacervats présentent des applications potentielles pour les procédés de micro et nano-encapsulation, le développement de structures multi-couches et la formation et stabilisation d'émulsions (**Cooper et al. 2005; Turgeon et al. 2007**).

Pour illustrer l'application potentielle d'encapsulation pour le transport et la libération de molécules bioactives, la Figure I-27 illustre le mécanisme d'absorption et de libération de β -carotène par les microsphères formées par assemblage d'eADF4 (**Spiess et al. 2010**). Ce mécanisme résulte d'études *in vitro* réalisées avec différentes molécules modèles qui ont également caractérisé l'influence du pH sur la libération des molécules bioactives (**Lammel et al. 2011**).

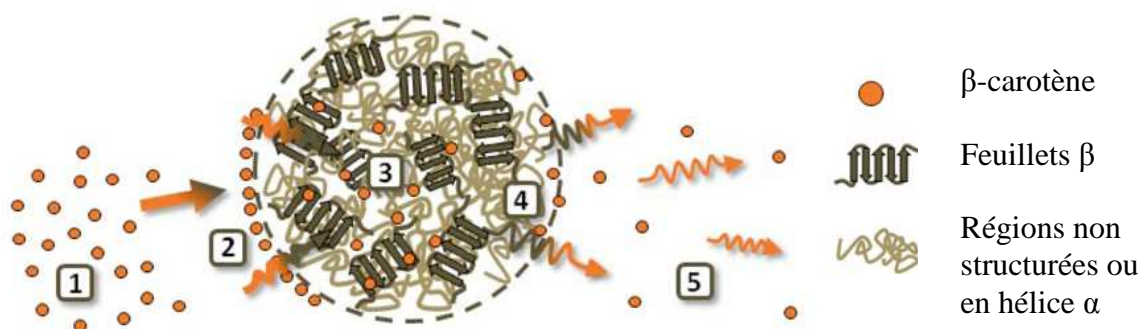


Figure I-27 : Mécanisme d'absorption et de libération de β -carotène dans les microsphères de protéines de soie d'araignée (eADF4). **1 :** les molécules sont attirées par la particule par des forces électrostatiques. **2 :** une fois la surface de la particule saturée, les molécules diffusent à l'intérieur des microsphères. **3 :** les molécules sont fixées par des associations hydrophobes et des interactions électrostatiques. **4 :** une fois l'ensemble des molécules absorbées, l'incubation dans un milieu adéquat (pH acide) résulte en une migration des molécules vers la surface des microsphères du fait d'un gradient de concentration. **5 :** les molécules sont lentement libérées dans le milieu.

L'utilisation des objets supramoléculaires implique donc des variations de conditions physico-chimiques et donc une altération de la balance de forces régissant leur assemblage. C'est pourquoi une connaissance parfaite des forces qui gouvernent leur stabilité est un pré requis indispensable pour d'une part pouvoir les fabriquer d'une manière contrôlée et d'autre part maîtriser leurs fonctionnalités.

4. Système d'étude

La formation d'objets supramoléculaires par interaction et assemblage de deux protéines alimentaires : l' α -lactalbumine issu du lactosérum bovin (LAC) et le lysozyme du blanc d'œuf (LYS) a été mise en évidence par notre groupe (*Nigen et al. 2007*). Ces deux protéines globulaires sont issues d'un gène ancestral commun et présentent de nombreuses similarités structurales bien que leur fonctions biologiques soient distinctes (*Qasba and Kumar 1997*). Ces deux protéines sont étudiées depuis de nombreuses années et constituent des protéines modèles pour l'étude du repliement des protéines globulaires (*Radford et al. 1992; Radford and Dobson 1995*). Nous allons présenter ces deux protéines avant de synthétiser l'ensemble des travaux précédemment réalisés sur ce système binaire. Enfin nous exposerons la démarche adoptée pour d'une part caractériser les interactions à l'échelle moléculaire et d'autre part poursuivre l'étude de leur mécanisme d'assemblage.

4.1. L' α -lactalbumine et le lysozyme

4.1.1. Origines

L' α -lactalbumine est contenue dans le lactosérum du lait. Le lait est composé de deux fractions protéiques distinctes : les caséines qui précipitent à pH 4.6 et les protéines solubles à ce pH. Cette fraction représente 20% des protéines totales du lait et est composée en majorité de β -lactoglobuline (2 à 4 g/l) et d' α -lactalbumine (1.5 g/l). Les autres protéines minoritaires sont les immunoglobulines, la sérum albumine bovine, la lactoferrine et la lactopéroxydase (*Livney 2010*).

Le blanc d'œuf de poule contient principalement des protéines, telles que l'ovalbumine (57 g/l), l'ovotransferrine (13 g/l), l'ovomucoïde (11.5 g/l), l'ovomucine (3.7 g/l) et le lysozyme à environ 3.6 g/l (*Stevens 1991*).

4.1.2. Fonctions biologiques

Alors que l' α -lactalbumine est impliquée dans la synthèse du lactose dans les glandes mammaires, le lysozyme est une enzyme antibactérienne hydrolysant les sucres (peptidoglycane de la membrane bactérienne).

L' α -lactalbumine constitue l'unité régulatrice de la lactose synthase en formant un complexe transitoire avec la galactosyltransférase (*Grobler et al. 1994*). Le lactose est un disaccharide composé de galactose et de glucose relié par une liaison glycosidique de type β (1 \rightarrow 4). En présence d'UDP-Galactose, l' α -lactalbumine favorise la fixation de glucose à l'enzyme qui catalyse la formation de la liaison glycosidique par transfert du galactose sur le glucose. La fixation de l' α -lactalbumine à la galactosyltransférase implique des acides aminés apolaires et hydrophobes tels que A106, H107, K114, Q117 et W118 (*Pike et al. 1996*). Ces résidus sont proches de F31 et H32 qui favorisent la fixation du glucose à l'enzyme.

Des études *in vitro* ont également montré qu'en présence d'un cofacteur, l'acide oléique, l' α -lactalbumine peut induire l'apoptose de cellules tumorales lorsqu'elle est à pH acide. Ce complexe est connu sous le nom de HAMLET (Human α -lactalbumin Made Lethal to Tumor Cells) lorsque l' α -lactalbumine est issu du lait humain et BAMLET (Bovin α -lactalbumin Made Lethal to Tumor Cells) pour l' α -lactalbumine bovine. (*Håkansson et al. 1995; Svensson et al. 1999; Lisková et al. 2010; Mossberg et al. 2010*). L' α -lactalbumine présente également une bioactivité particulière lorsqu'elle est dans le lactosérum. Elle protège les muqueuses gastriques et réduit la formation d'ulcère (*Matsumoto et al. 2001; Ushida et al. 2003*). Des propriétés antioxydantes et antibactériennes de peptides issus de sa digestion ou de sa fermentation ont également été rapportées (*Kamau et al. 2010*).

Le lysozyme est une enzyme antibactérienne impliquée dans l'hydrolyse du peptidoglycane de la membrane des bactéries à Gram positif. Ce polysaccharide est composé d'acide N-acétyl-muramique et de N-acétyl-glucosamine reliés par des liaisons glycosidiques 1 \rightarrow 4. Le site de fixation des oligosaccharides est localisé dans la crevasse du lysozyme situé entre ces deux domaines structuraux. La réaction d'hydrolyse de cette liaison glycosidique est une catalyse acide impliquant le groupement carboxylique porté par le carbone γ du résidu E35 ainsi que le groupement carboxylate porté par le carbone β du résidu D52 qui stabilise le carbocation, intermédiaire de réaction (*Phillips 1967*).

4.1.3. Structures tridimensionnelles

L' α -lactalbumine et le lysozyme sont deux protéines globulaires d'environ 14 kDa composées de 123 et 129 acides aminés respectivement. Ces deux protéines ont une identité de séquence d'environ 35% et présentent des structures tridimensionnelles similaires (Figure I-28). Ce sont des protéines $\alpha+\beta$, composées d'un domaine α contenant quatre hélices α et d'un domaine β composé d'un feuillet β antiparallèle à trois brins et d'une boucle flexible. Les deux domaines sont stabilisés par quatre ponts disulfures.

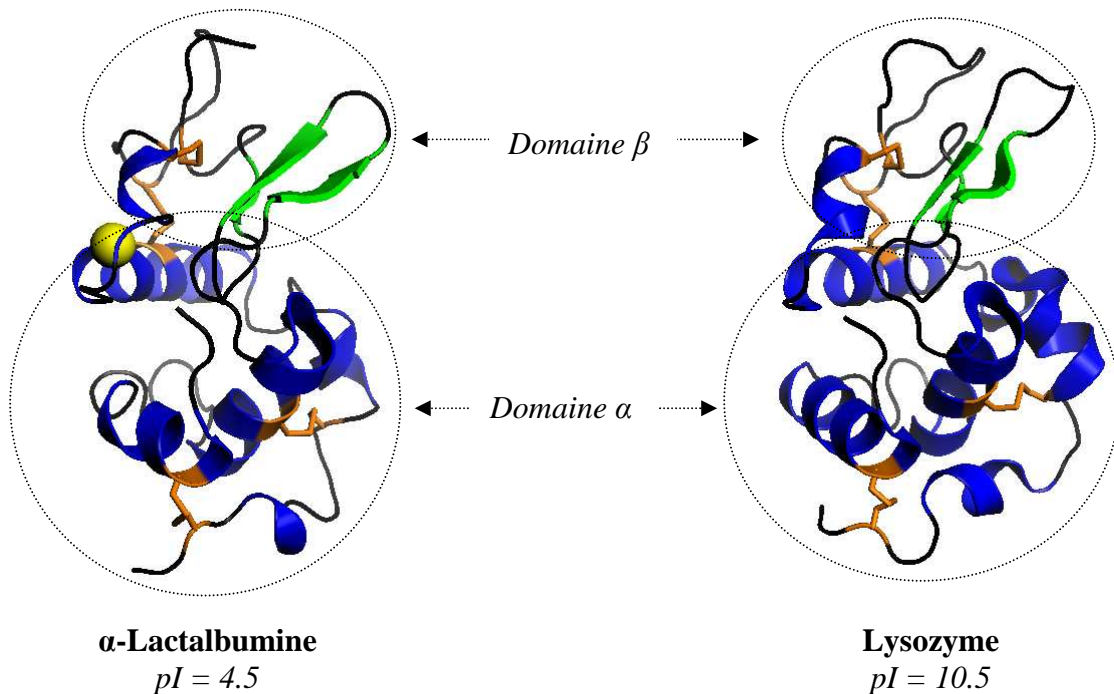


Figure I-28 : Représentation moléculaire de l' α -lactalbumine et du lysozyme. Ces deux protéines sont des protéines $\alpha+\beta$, composées de deux domaines structuraux reliés par quatre ponts disulfures impliquant 8 résidus cystéine (orange). Les figures ont été produites avec Pymol et les fichiers pdb correspondants : 1F6S (*Chrysina et al. 2000*) et 2VB1 (*Wang et al. 2007*).

4.1.4. Stabilité et propriétés physico-chimiques

Ces deux protéines se distinguent par leur stabilité et leur propriété de fixation des métaux.

Le lysozyme est très stable à des pH extrêmes (*Fink et al. 1994*) et sa température de dénaturation est élevée (74°C) (*Shih et al. 1995*). De plus, une caractéristique du lysozyme de poule est de ne présenter aucun site de fixation aux métaux, contrairement à des lysozymes d'autres origines, tels que le lysozyme du lait de jument ou le lysozyme du blanc d'oeuf de pigeon (*Acharya et al. 1994*). Inversement, la stabilité et la structure de l' α -lactalbumine sont très sensibles au pH et l' α -lactalbumine présente un site de fixation au calcium de haute affinité (10^{-7} - 10^{-8} M) (*Kronman et al. 1981; Bushmarina et al. 2006*). Cette constante dépend du pH et de la température (*Griko and Remeta 1999; Hendrix et al. 2000*). Le site de fixation est localisé dans la boucle qui connecte les deux domaines où l'atome de Ca^{2+} (représenté par une sphère jaune sur la Figure I-28) est coordonné par sept atomes d'oxygènes impliquant les groupements carboxyles de D82, D87 et D88 et les groupements carbonyles de K79 et D84 ainsi que deux molécules d'eau (*Stuart et al. 1986*).

Le calcium joue un rôle structural important pour la stabilité et le repliement de l' α -lactalbumine. D'un point de vue cinétique, sa présence accélère le repliement de la protéine de trois ordres de grandeur (*Forge et al. 1999*). D'un point de vue thermodynamique, la forme complexée à Ca^{2+} , appelée holo α -lactalbumine (holoLAC) a une température de dénaturation de 64°C alors que la forme décalcifiée, l'apo α -lactalbumine (apoLAC) a une température de dénaturation de 26°C (à pH 7.5) (*Griko and Remeta 1999*). Cette diminution de stabilité est expliquée par une augmentation des répulsions électrostatiques entre les charges négatives non compensées des résidus composant le site de fixation du calcium. La stabilité de la forme apo dépend de la force ionique (*Griko et al. 1994; Griko and Remeta 1999*). En effet la compensation partielle des charges négatives par ajout de KCl ou NaCl stabilise la protéine mais leur neutralisation complète n'est possible qu'en présence de Ca^{2+} où les liaisons sont correctement coordonnées.

Dans des conditions natives (température ambiante et pH neutre), la forme apo présente une structure tridimensionnelle comparable à celle de la forme holo (*Chrysina et al. 2000*). La boucle reliant les deux domaines est légèrement plus ouverte du fait d'une réorganisation des liaisons hydrogènes entre résidus et molécules d'eau du solvant lorsque le calcium est absent.

A pH acide, l'apo α -lactalbumine se trouve dans un état partiellement déplié appelé « molten globule » ou globule fondu. Cette conformation est caractérisée par la présence de structures secondaires natives mais une structure tertiaire instable (*Dolgikh et al. 1981; Kuwajima 1996; Troullier et al. 2000*). La spectroscopie infrarouge montre une légère diminution du contenu en feuillets β compensée par la présence de coudes ainsi qu'un élargissement des pics du spectre indiquant une plus grande flexibilité des structures secondaires (*Troullier et al. 2000*), en particulier celles composant le domaine β (*Forge et al. 1999*). Les quatre ponts disulfures sont conservés et d'après des expériences de RMN, une proportion importante des interactions natives persistent entre les chaînes latérales (*Balbach et al. 1997*). Cependant l'élargissement des résonances RMN témoigne de l'existence de nombreuses conformations différentes en interconversion rapide (*Alexandrescu et al. 1993*). C'est pourquoi la structure tertiaire est dite instable. Cet état est également moins compact (*Kataoka et al. 1997*) et plus hydraté que la forme native. En conclusion, l'état « molten globule » est plus dynamique et plus flexible que la forme native.

Dans le cas du lysozyme, l'état « molten globule » a été observé pour le lysozyme de blanc d'œuf de pigeon en absence de calcium à pH 2 (*Morozova et al. 1995*). Cependant, dans le cas du lysozyme du blanc d'œuf de poule, un état partiellement déplié a été observé lors des études de repliement mais c'est un intermédiaire cinétique transitoire qui n'est pas stable thermodynamiquement (*Radford et al. 1992*). Inversement, l'apo α -lactalbumine peut être stabilisée dans sa conformation « molten globule » à pH acide mais également à pH neutre et faible force ionique (*Griko et al. 1994*) ou par dénaturation thermique (*Dolgikh et al. 1985; Griko and Remeta 1999*). Lorsque la température est supérieure à sa température de dénaturation, l'apo α -lactalbumine adopte cet état partiellement déplié et l'exposition partielle en surface des clusters aromatiques, enfouis à l'intérieur de la protéine dans sa conformation native, augmente sa réactivité et favorise son assemblage via des interactions hydrophobes.

Une autre propriété physico-chimique importante qui distingue ces deux protéines est leur point isoélectrique. Alors que l' α -lactalbumine est une protéine acide avec un pI de 4.5, le lysozyme est une protéine basique (pI 10.5) du fait d'une grande proportion en résidus arginine et lysine. A pH neutre, l' α -lactalbumine porte donc un excès de charges négatives alors que le lysozyme porte un excès de charges positives.

Comme nous allons le détailler dans le paragraphe suivant, cette différence de charge favorise les interactions électrostatiques entre l' α -lactalbumine et le lysozyme et l'état partiellement déplié de l'apo α -lactalbumine favorise son assemblage avec le lysozyme en objets supramoléculaires ordonnés.

4.2. Interactions et assemblages de l' α -lactalbumine et du lysozyme

Des objets supramoléculaires sont formés par interaction et assemblage du lysozyme avec la forme décalcifiée de l' α -lactalbumine à pH 7.5 et à force ionique relativement faible (*Nigen et al. 2007*). La morphologie des objets formés dépend de la température (Figure I-29): des agrégats amorphes sont formés à une température inférieure à la température de dénaturation de l'apo α -lactalbumine alors que des objets sphériques de 1 à 5 μm de diamètre, appelés microsphères, sont formés à une température supérieure. L'état conformationnel de l'apo α -lactalbumine est donc un facteur déterminant pour la morphologie des objets formés puisque les microsphères sont formées lorsque l' α -lactalbumine est dans son état molten globule.

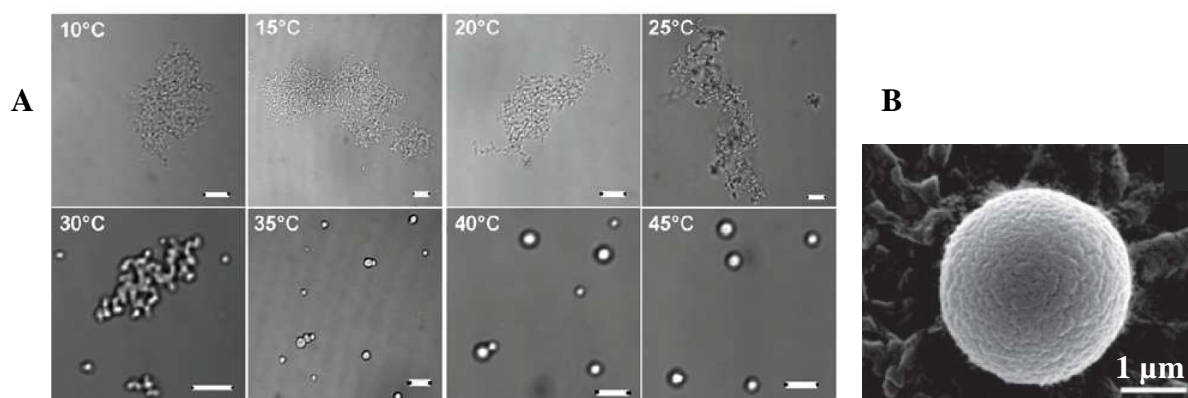


Figure I-29 : A : Objets supramoléculaires résultant de l'assemblage du lysozyme et de l'apo α -lactalbumine en fonction de la température. (Observations par microscopie optique, la barre d'échelle correspond à 5 μm (10-25°C) et 3 μm (30-45°C)) (*Nigen 2009*). **B :** Microsphères formées à 45°C observées par microscopie électronique à balayage (*Nigen et al. 2007*).

Les conditions physico-chimiques favorables à la formation des microsphères ont été clairement établies. Le pH optimum de formation est pH 7.5 où les deux protéines portent une charge nette opposée et égale en valeur absolue (+7 pour le lysozyme et -7 pour l'apo α -lactalbumine). D'autre part, la proportion de protéines assemblées diminue lorsque la force

ionique est augmentée. L'assemblage est donc principalement gouverné par des forces électrostatiques attractives et une augmentation de l'entropie due au relargage de contre-ions (*Nigen et al. 2009*). Cependant, une fois les microsphères formées, l'ajout de sels ne permet pas leur déstructuration complète. Cette observation met en évidence la présence d'autres forces stabilisatrices au sein de ces objets une fois formés, telles que des interactions hydrophobes, des liaisons de van der Waals et des liaisons hydrogènes.

La taille et le nombre des microsphères augmentent avec la concentration en protéine totale. Cependant une proportion non négligeable de protéines reste en solution indiquant un équilibre de phase entre protéines assemblées et protéines solubles. Celles-ci peuvent être sous formes monomériques ou dans un état oligomérique soluble et sont en équilibre dynamique avec les protéines assemblées. En effet un échange entre protéine assemblées et protéines solubles (Figure I-30) a été mis en évidence (*Nigen et al. 2010*).

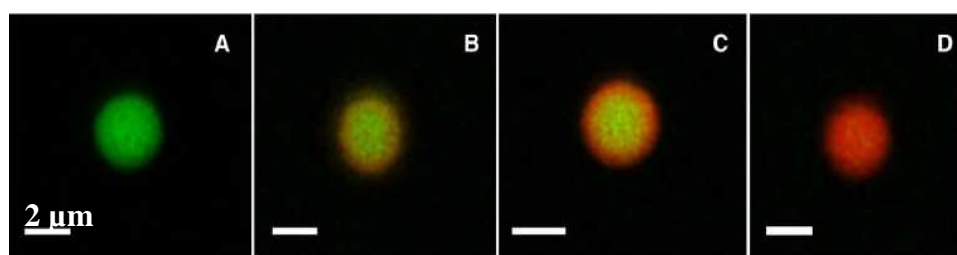


Figure I-30 : Echange entre protéines libres et protéines assemblées mis en évidence par microscopie confocale à balayage laser. Les microsphères ont été formées par mélange équimolaire d'apo α -lactalbumine et de lysozyme marqué à la fluorescéine (vert) (A) puis du lysozyme marqué à la rhodamine (rouge) a été ajouté à la solution. Une couronne rouge est observée après 5 min (B) et celle-ci progresse vers le centre des objets après 15 min (C). L'échange est complet après 75 min (D) d'incubation. (*Nigen et al. 2010*)

L'utilisation de la microscopie confocale à balayage laser a également mis en évidence une répartition homogène et une co-localisation des deux protéines dans les microsphères. De plus, quel que soient les concentrations initiales en protéines, celles-ci sont présentes en quantité équimolaire dans les objets formés (*Nigen et al. 2007*). Ces observations suggèrent que l'unité de base des microsphères est l'hétérodimère composé d'apo α -lactalbumine et de lysozyme (apoLAC-LYS). Le mécanisme de formation des microsphères a été étudié à l'échelle mésoscopique en préparant des suspensions à différentes concentrations en protéines (de 20 à 200 μ M) (Figure I-31). L'observation des suspensions par microscopie électronique à transmission suggère que la formation des microsphères suit un mécanisme d'agrégation-

réorganisation contrôlée cinétiquement par la concentration totale en protéines. Les hétérodimères s'associeraient en agrégats amorphes (observés à 20 μM) qui se réorganisent en nanosphères (40 μM). Ces nanosphères s'agrègent ensuite pour former des amas branchés (100 μM) qui se réorganisent à leur tour en microsphères (200 μM) (*Nigen et al. 2010*).

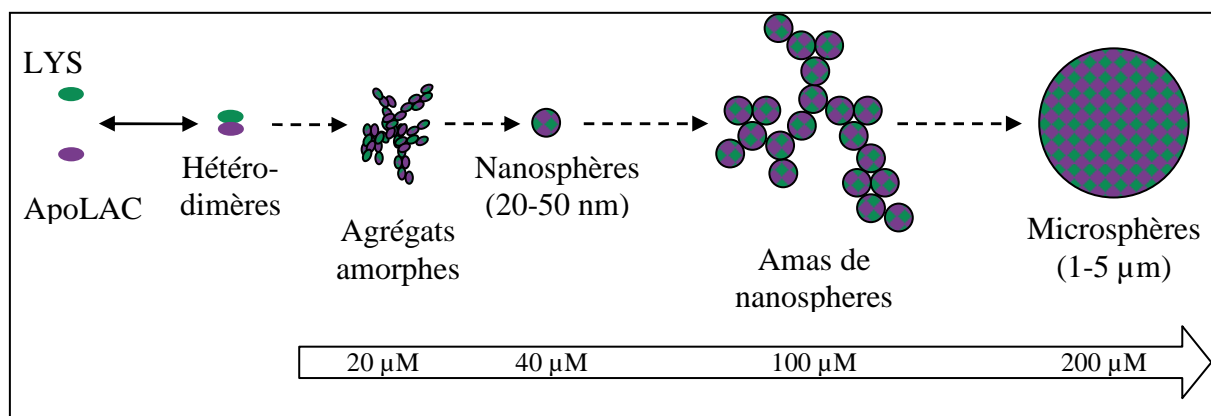


Figure I-31 : Mécanisme hypothétique d'assemblage de l'apo α -lactalbumine (apoLAC) et du lysozyme (LYS) en microsphères selon des observations réalisées par microscopie électronique à transmission à différentes concentrations totales en protéines après incubation 30 min à 45°C de mélanges équimolaires. Schéma adapté de (*Nigen et al. 2010*).

L'existence d'un hétérodimère au stade initial de l'interaction a été approchée par des expériences d'anisotropie de fluorescence (*Nigen et al. 2009*) en travaillant à faible concentration (1 μM). Ces travaux ont également montré que le lysozyme interagit aussi avec la forme calcifiée de l' α -lactalbumine, l'holo α -lactalbumine, bien que ces interactions ne mènent pas à la formation d'objets supramoléculaires dans les conditions étudiées. A 10 et 45°C, la constante d'affinité du lysozyme est de l'ordre du micromolaire pour les deux formes de l' α -lactalbumine. La forme holo est dans sa conformation native alors que l'apo α -lactalbumine adopte une conformation native à 10°C et un état « molten globule » à 45°C. Par conséquent, l'état conformationnel de l' α -lactalbumine n'influence pas son affinité avec le lysozyme. Cependant, le temps de corrélation calculé à 45°C est différent selon l'hétérodimère étudié et suggère une conformation distincte pour chaque hétérodimère. De plus, l'état partiellement déplié de l'apo α -lactalbumine à 45°C est susceptible d'apporter une réactivité particulière aux hétérodimères apoLAC-LYS du fait de l'exposition de régions hydrophobes en surface de l'apo α -lactalbumine, favorisant leur assemblage par associations hydrophobes.

Ces résultats expérimentaux d'interactions entre le lysozyme et l' α -lactalbumine obtenus par notre groupe ont été par la suite validés par simulation moléculaire selon la méthode Monte Carlo (*Persson and Lund 2009*). Des hétérodimères stables sont obtenus par interaction du lysozyme avec les deux formes de l' α -lactalbumine. L'influence du pH et de la force ionique du milieu sur la force du potentiel d'interaction confirme que la première reconnaissance moléculaire entre ces deux protéines implique des attractions électrostatiques s'exerçant à longue distance. Ces simulations ont également souligné l'effet de la répartition des charges sur l'orientation préférentielle des protéines en considérant des interactions de type dipôle-ion. Alors que les charges positives sont uniformément réparties à la surface du lysozyme, les charges négatives à la surface de l' α -lactalbumine sont réparties de manière hétérogène. Par conséquent le moment dipolaire global de l' α -lactalbumine est nettement supérieur à celui du lysozyme. Cet effet est augmenté dans le cas de l'apo α -lactalbumine car la déplétion en calcium augmente localement les charges négatives présentes à la surface de la protéine. Cette différence de moment dipolaire induit une orientation préférentielle du lysozyme autour de l' α -lactalbumine (Figure I-32). Le lysozyme interagit avec l' α -lactalbumine au niveau du pôle négatif du moment dipolaire de celle-ci alors que l' α -lactalbumine ne présente aucune orientation préférentielle autour du lysozyme, sa répartition étant plus diffuse autour du celui-ci.

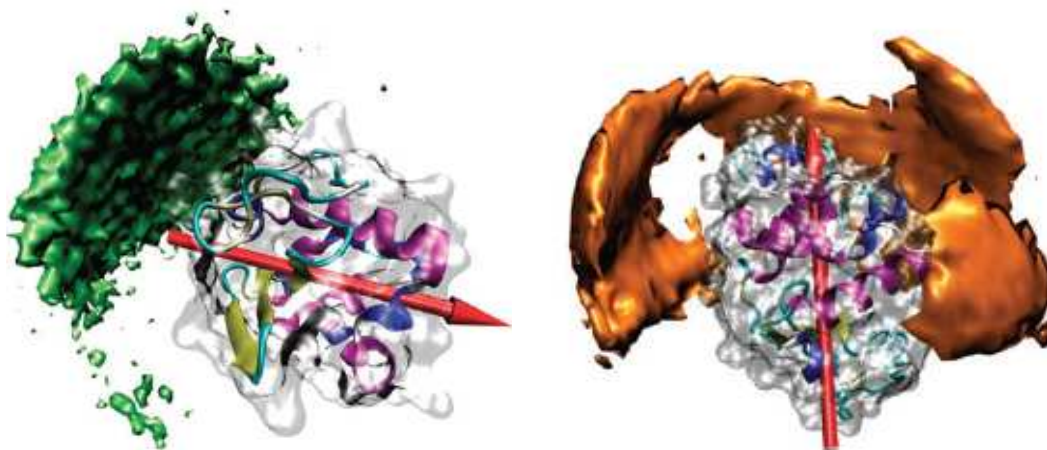


Figure I-32 : Résultats obtenus par simulation moléculaire Monte Carlo (pH 7.5, force ionique 5 mM) montrant l'orientation des protéines dans le dimère holo α -lactalbumine-lysozyme. **A :** La surface d'isodensité du lysozyme (vert) est localisée au niveau du pôle négatif du moment dipolaire (flèche rouge) de l' α -lactalbumine (représentée en ruban). **B :** La surface d'isodensité (orange) de l'holo α -lactalbumine est répartie autour de l'axe équatorial du lysozyme. Les surfaces d'isodensité représentent la distribution la plus probable du centre de masse d'une protéine (ion) autour de son partenaire (dipôle). (*Persson and Lund 2009*)

En conclusion, les études physico-chimiques réalisées ont mis en évidence l'implication des interactions électrostatiques dans la reconnaissance des protéines et leur assemblage. Les objets formés ont été caractérisés à l'échelle macroscopique par de nombreuses techniques de microscopie. Il semble que les changements conformationnels propres à l'apo α -lactalbumine et la formation d'un oligomère spécifique soient conjointement nécessaires à la formation d'objets supramoléculaire ordonnés.

Dans le but d'approfondir la compréhension de ce système, nous avons réalisé une caractérisation à l'échelle moléculaire des interactions spécifiques menant à l'assemblage ainsi qu'une étude cinétique du mécanisme de formation des objets supramoléculaires. Ces travaux visent d'une part à apporter des éléments fondamentaux pour la compréhension des systèmes protéiques binaires et d'autre part à contrôler davantage la formation des microsphères pour envisager leurs applications potentielles.

4.3. Etude à l'échelle moléculaire et mécanisme d'assemblage

Bien qu'il soit reconnu que l'anisotropie, la structure hiérarchisée et les propriétés des objets supramoléculaires assemblés découlent des interactions à l'échelle moléculaire, il n'y a pas de règle expliquant comment l'information contenue à l'échelle moléculaire est propagée aux échelles macroscopiques (*Viney 2004*). Ces mécanismes sont propres à chaque système. Nous avons vu que la mutagenèse dirigée ou des études par hydrolyse partielle peuvent être réalisées pour identifier les zones d'interaction. Cependant, il est important de souligner que peu d'études ont été réalisées dans le but de caractériser les interactions à l'échelle moléculaire.

Dans le but de comprendre, comment les informations contenues à l'échelle moléculaire gouverne la formation de microsphères par assemblage d'apo α -lactalbumine et de lysozyme, le projet de cette thèse consiste à caractériser les interactions à l'échelle moléculaire et à établir le processus mécanistique par lequel les protéines en solution s'assemblent en objets supramoléculaires.

Pour ce faire, nous avons utilisé diverses techniques de biophysique apportant des informations complémentaires puisqu'elles permettent de caractériser le système à différentes échelles. Les travaux réalisés et les résultats obtenus sont présentés en 3 chapitres.

Le Chapitre 1 est dédié à la caractérisation moléculaire des interactions à l'échelle des hétérodimères.

- Quels sont les acides aminés des protéines impliqués dans la formation des unités élémentaires, les hétérodimères apoLAC-LYS ?
- Les compositions des interfaces des hétérodimères apoLAC-LYS et holoLAC-LYS permettent-elles d'expliquer pourquoi seuls les hétérodimères apoLAC-LYS sont capables de s'assembler en objets supramoléculaires ?

Les interactions au sein des hétérodimères ont été caractérisées par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) bidimensionnelle en utilisant la méthode dite du « Chemical Shift Mapping ». Ainsi les acides aminés composant les interfaces des dimères apoLAC-LYS et holoLAC-LYS ont été identifiés dans les conditions physico-chimiques favorables à la formation des microsphères. Ces travaux ont été complétés par une approche de simulation moléculaire selon la méthode Monte Carlo.

Le Chapitre 2 est consacré à la caractérisation des interactions à l'échelle moléculaire au sein des microsphères.

- Quelles sont les régions des protéines impliquées dans les interactions gouvernant la formation et la stabilité des objets supramoléculaires ?
- Y a-t-il des réarrangements structuraux favorisant la formation de microsphères ?

Comme nous l'avons souligné au travers d'exemples variés, l'assemblage de protéines en objets ordonnés peut impliquer la perte de structures secondaires natives et la formation de structures secondaires non natives (feuillet β). Les éventuels changements structuraux des protéines assemblées ont donc été quantifiés par spectroscopie infrarouge en comparant les structures secondaires des protéines assemblées à celles des protéines individuelles en solution. Nous avons également tenté de sonder des changements de structures plus fins en appliquant la méthode des échanges hydrogène/deutérium. En effet cette méthode lorsqu'elle est suivie par RMN permet d'accéder à des changements structuraux plus fins que la spectroscopie infrarouge puisque l'information est obtenue à l'échelle du résidu.

Le Chapitre 3 est dédié aux cinétiques des mécanismes d'assemblage.

- Par quel mécanisme les protéines monomériques s'assemblent-elles en objets supramoléculaires ?
- Quelles sont les étapes intermédiaires entre les hétérodimères et les objets supramoléculaires ?
- A quel niveau la température influence-t-elle la morphologie des objets formés ?

Le mécanisme d'assemblage a été établi en étudiant la réaction de formation des microsphères en temps réel par diffusion de lumière. Cette approche permet de caractériser les objets formés selon des paramètres de forme tels que leur masse molaire moyenne, leur rayon de giration, leur rayon hydrodynamique et fournit également des informations sur la structure interne des objets. En modulant les conditions physico-chimiques telles que la concentration en protéine et la force ionique nous sommes parvenus à ralentir la formation des objets supramoléculaires et à caractériser la croissance de particules sub-micrométriques.

II. Matériels et Méthodes

1. Matériels d'étude

1.1. Purification des protéines naturelles

Le lysosyme (LYS) de poule utilisé dans cette étude a été fourni par Ovonor (Annezin les Betune, France). Après séparation par chromatographie d'échange de cations, il est purifié à partir du blanc d'oeuf par cycles de cristallisation à pH basique, et solubilisation à pH acide. La poudre contient 95% de LYS et 3% d'ions chlorures.

L' α -lactalbumine (LAC) a été purifiée du lactosérum bovin selon la méthode décrite par Caussin et coll. (*Caussin et al. 2003*). La forme apo de l' α -lactalbumine a été obtenue par décalcification de l'holo α -lactalbumine. Une solution d'holo α -lactalbumine à 20 g.L⁻¹ est dialysée contre de l'eau déionisée à pH 3 pendant 48 h à 4°C en utilisant des membranes de dialyse avec un seuil de coupure de 3500 Da (Spectra/Por® Dialysis, Spectrum Laboratoires, Inc). Après dialyse, le pH de la solution est ajusté à pH 7.5 et la solution lyophilisée. La poudre d'apo α -lactalbumine ainsi obtenue contient moins de 2% de calcium.

1.2. Production et purification de protéines recombinantes

L' α -lactalbumine et le lysozyme ont été uniformément marquées avec les isotopes ¹⁵N ou ¹³C en cultivant des bactéries (*E.Coli* BL21DE3) en milieu minimum M9, contenant ¹³C-glucose et ¹⁵NH₄Cl (Euriso-top, France) comme unique source de carbone et d'azote. Les bactéries sont préalablement transformées avec les plasmides pet3a ou pet11a, portant respectivement les gènes d'intérêt de l' α -lactalbumine et du lysozyme. La croissance des bactéries est suivie par mesure d'absorbance (ou densité optique, DO) à 600 nm (Figure II-1) et lorsque celles-ci étaient entrées en phase de croissance (DO_{600nm}~0.5), la production des protéines recombinantes est provoquée par l'induction de l'expression des gènes par ajout de 1 mM d'IPTG (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside). L'expression des protéines recombinantes est détectée par gel SDS-page (Figure II-1). Après centrifugation des échantillons, les surnageants et culots sont dilués dans un tampon Laemmli 4X contenant 20% de β -mercaptoethanol puis incubés 3 min à 95°C pour dénaturer les protéines, avant d'être déposés sur le gel SDS-page. La migration par électrophorèse est réalisée à 150 V, - 30 mA.

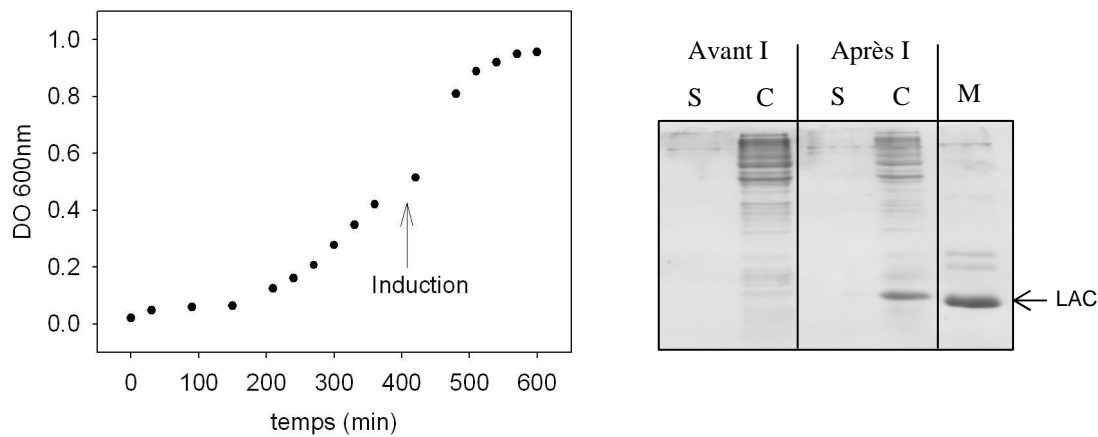


Figure II-1 : Croissance d'*E.Coli* sur milieu M9 pour la production de ^{15}N - α -lactalbumine. Gel SDS-page après centrifugation d'un aliquot de culture (S : surnageant, C : culot) avant et après induction (I) avec 1 mM IPTG. Le marqueur (M) est une solution d' α -lactalbumine purifiée du lactosérum à 0.05 mM.

L' α -lactalbumine et le lysozyme recombinants ont été respectivement purifiés selon les méthodes décrites par Grobler et coll. (*Grobler et al. 1994*) et Schlörb et coll. (*Schlörb et al. 2005*). Les protéines recombinantes sont produites sous forme de corps d'inclusion dans la bactérie. L'extraction des corps d'inclusion est réalisée par la lyse des cellules (sonication), suivie de la solubilisation des membranes par traitement au Triton 100X. L'ultra-centrifugation (45 min, 40 000 rpm, ultracentrifugeuse L75-Beckman, Beckman Coulter Inc, France) des solutions obtenues permet d'isoler les corps d'inclusion des protéines solubles (Figure II-2 : S1) et membranaires (Figure II-2 : S2). Ceux-ci sont ensuite traités à l'urée 8 M afin de solubiliser les protéines (Figure II-2 : S3).

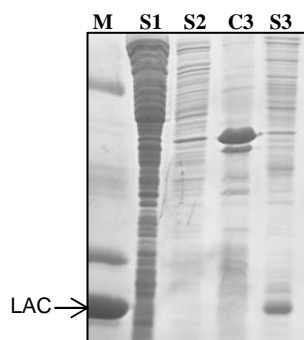


Figure II-2 : Gel SDS-page correspondant à l'extraction des corps d'inclusion d'une culture bactérienne exprimant le gène de l' α -lactalbumine recombinante. Fractions obtenues après centrifugation (S : surnageant, C : culot) des solutions obtenues après lyse cellulaire (1), traitement au Triton 100X (2), et après resolubilisation des corps d'inclusion dans 8 M urée (3). Le marqueur (M) est une solution d' α -lactalbumine purifiée du lactosérum à 0.05 mM.

Cet extrait de protéines dénaturées (S3) sont ensuite déposés sur une colonne à échange d'ion afin d'isoler la protéine d'intérêt des autres protéines bactériennes. Le

chromatogramme obtenu en injectant l' α -lactalbumine recombinante sur une colonne (XK26/20, GE Healthcare, France) contenant une matrice de haute affinité aux anions (Q-sepharoseTM Fast Flow, GE Healthcare, France) ainsi que le gel SDS des fractions collectées en sortie sont présentés en Figure II-3. L'accolade indique les fractions en sortie de colonne à échange d'ion qui contiennent principalement la protéine recombinante et qui ont été regroupées pour les étapes suivantes. La purification du lysozyme est quand à elle réalisée sur une colonne de faible affinité aux cations (CM-sepharoseTM Fast Flow, GE Healthcare, France).

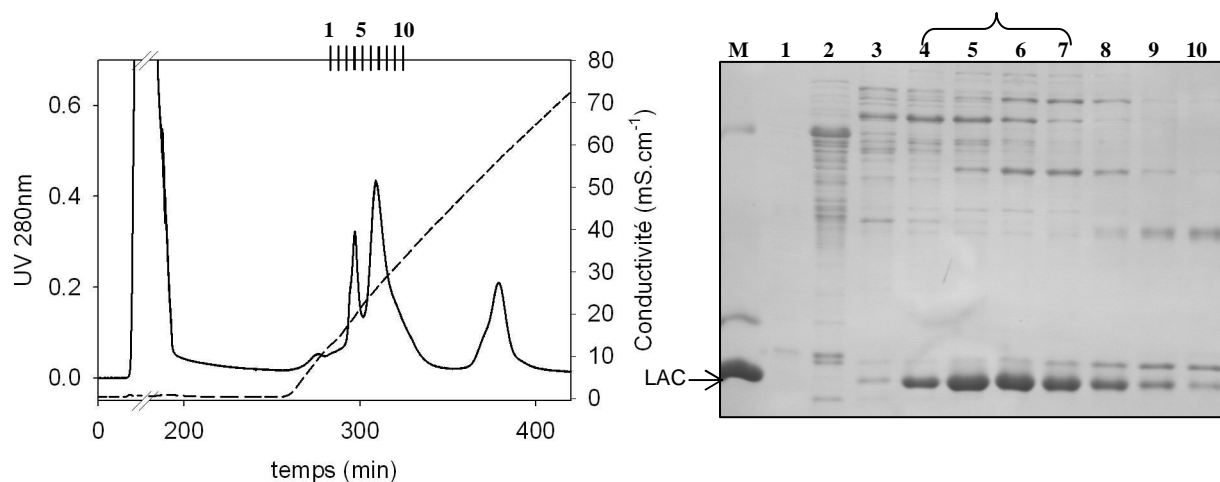


Figure II-3 : Profile d'élution de chromatographie de haute affinité aux anions (Q-sepharose) (injection de S3, Fig II-2). L'élution était réalisée par un gradient de NaCl (ligne pointillé : conductivité) et suivie par mesure de la densité optique à 280 nm (ligne pleine). Gel SDS-page des différentes fractions collectées. Le marqueur (M) est une solution de l' α -lactalbumine purifiée du lactosérum à 0.05 mM.

L'étape suivante consiste à replier la protéine d'intérêt en ajoutant des agents redox (pour former les ponts disulfures natifs) et en diminuant la concentration en urée. L' α -lactalbumine était repliée par ajout d'HEDS/ β -mercaptoéthanol (HEDS pour hydroxyethyldisulfide, forme oxydée du β -mercaptoéthanol) puis dialyse contre un gradient décroissant d'urée (membranes à dialyse Spectra/Por® Dialysis, de seuil de coupure 3500 Da, Spectrum Laboratoires, Inc), alors que le lysozyme est replié par dilution rapide dans un tampon de renaturation contenant les glutathiones réduite (GSH) et oxydée (GSSG). Dans les deux cas, le repliement est réalisé à 4°C et une dernière dialyse contre de l'eau déionisée est réalisée après repliement.

Une fois la protéine repliée, une dernière étape de chromatographie d'exclusion de taille permet de purifier davantage l' α -lactalbumine recombinante (Figure II-4) en injectant la solution de protéine repliée préalablement concentrée sur une colonne Hiload 16/60 Superdex™ 75 prep grade (GE Healthcare, France). Enfin les protéines sont concentrées puis lyophilisées et stockées à - 20°C.

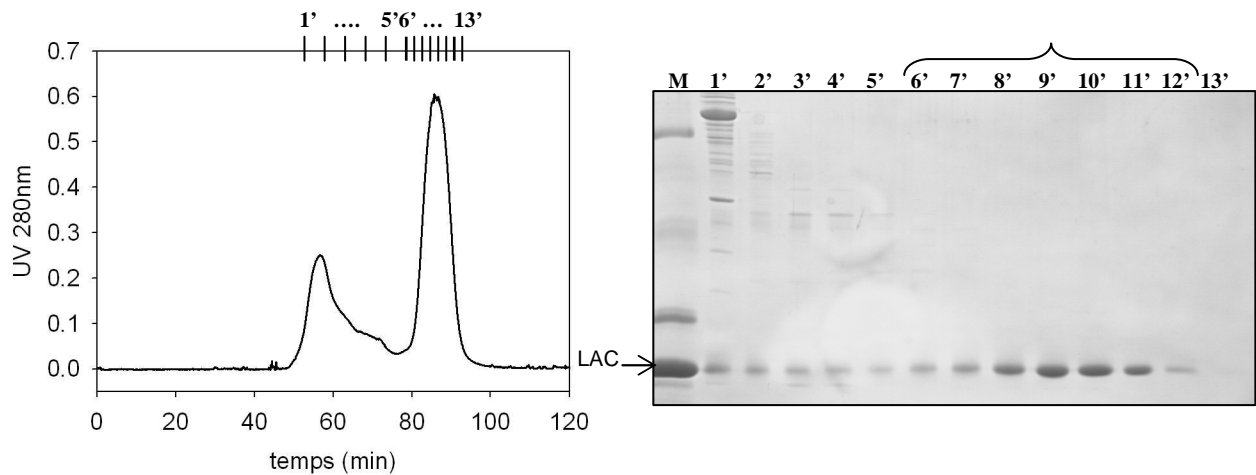


Figure II-4 : Profile d'élution de chromatographie d'exclusion de taille après repliement de ^{15}N - α -lactalbumine. L'élution était suivie par mesure de la densité optique à 280 nm. Gel SDS-page des différentes fractions collectées. Le marqueur (M) est une solution de l' α -lactalbumine purifiée du lactosérum à 0.05 mM.

Le Tableau II-1 récapitule les rendements de purification obtenus pour l' α -lactalbumine recombinante.

	Rendement (g protéines /L culture)	Quantité disponible (mg)
^{15}N -LAC	0.3 – 0.4	~5
^{13}C -LAC	0.1	0.4
^{15}N , ^{13}C -LAC	0.05	0.4

Tableau II-1 : Rendements de purification d' α -lactalbumine recombinante enrichée en ^{15}N et/ou en ^{13}C et quantité disponible (rendement rapporté aux litres de culture produits).

Les faibles rendements de purification (< 1g/L) sont dus à des pertes non réductibles lors des différentes étapes de purification (resolubilisation incomplète des corps d'inclusion, perte de protéine dans les fractions contaminées en sortie de chromatographie à échange ion et chromatographie d'exclusion de taille). Enfin, aucun rendement de purification du lysozyme recombinant n'est indiqué car nous ne sommes pas parvenus à obtenir une protéine correctement repliée ; cette dernière étape s'est avérée très sensible à l'agrégation.

Voici brièvement les essais réalisés pour optimiser la purification du lysozyme recombinant. Lors de l'extraction du lysozyme, la méthode décrite par Schlörb et coll. préconise de solubiliser les corps d'inclusion dans 4 M d'urée, la concentration en urée étant ajustée à 8 M avant l'étape de repliement. En procédant ainsi, nous avons observé des pertes dans le culot urée (C3) après centrifugation, nous avons donc décidé de traiter les corps d'inclusion avec 8 M d'urée et de laisser incuber sur la nuit. La resolubilisation des protéines a ainsi été légèrement améliorée malgré une perte irréductible d'environ 10% de lysozyme recombinant (C3, Figure II-5, à noter que lors du dépôt sur le gel SDS-page le culot urée, C3, à été resolubilisé dans un volume 10 fois plus petit que le volume du surnageant urée S3).

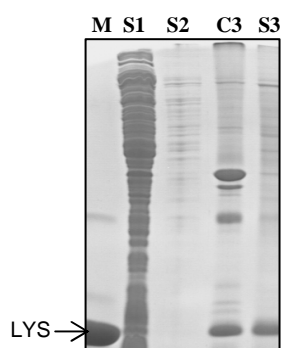


Figure II-5 : Gel SDS-page correspondant à l'extraction des corps d'inclusion d'une culture bactérienne exprimant le gène du lysozyme. Fractions obtenues après centrifugation (S : surnageant, C : culot) des solutions après lyse cellulaire (1), traitement au Triton 100X (2), et après resolubilisation des corps d'inclusion dans 8 M urée (3). Le marqueur (M) est une solution de lysozyme commercial à 0.05 mM.

Lors de la purification par chromatographie à échange d'ion (CM-sepharose), une quantité non négligeable de lysozyme ne s'accrochait pas sur la colonne et était perdue dans l'éluat (Figure II-6 : fractions a à d). Des essais ont été réalisés en augmentant la capacité de colonne ou en variant la force ionique de la solution mais cette perte n'a pu être réduite. Des contaminants sont également présents dans les fractions contenant le lysozyme recombinant en sortie d'échange d'ion (Figure II-6 : fractions 3 à 10). Ceux-ci pouvant empêcher le lysozyme de se replier correctement lors de la dilution rapide, nous avons ajouté une étape de chromatographie d'exclusion de taille avant l'étape de repliement dans le but de purifier davantage la protéine. La Figure II-7 montre le profile d'élution de chromatographie d'exclusion de taille obtenu pour les fractions 3 à 7 regroupées en sortie de chromatographie à échange d'ion.

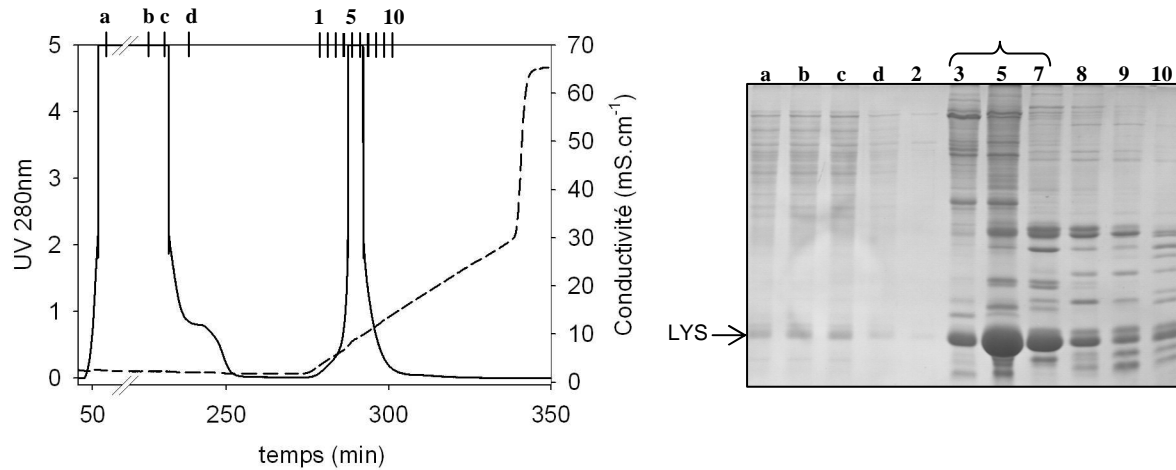


Figure II-6 : Profile d'élution de chromatographie à faible affinité aux cations (CM-sepharose) (injection de S3, Fig II-5). L'élution était réalisée par un gradient de NaCl (ligne pointillé : conductivité) et suivie par mesure de la densité optique à 280 nm (ligne pleine). Gel SDS-page des différentes fractions collectées. Le marqueur (M) est une solution de lysozyme commercial à 0.05 mM.

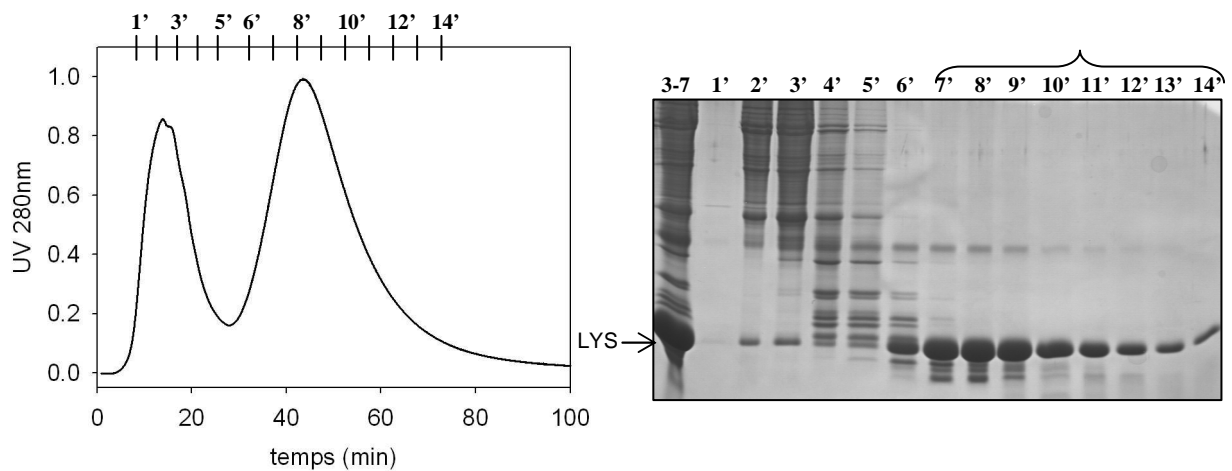


Figure II-7 : Profile d'élution de chromatographie d'exclusion de taille pour les fractions regroupées 3 à 7 (Fig II-6) et gel SDS-page des fractions collectées.

Le gel-SDS correspondant aux fractions en sortie de chromatographie d'exclusion de taille montre que cette alternative nous a effectivement permis de purifier davantage la protéine. En effet tous les contaminants de haut poids moléculaires sont contenus dans le premier pic en sortie de chromatographie d'exclusion de taille (Figure II-7 : fractions 1' à 5'). La solution de ^{15}N -lysozyme a été constituée par regroupement des fractions 7' à 14'.

Différents essais de repliement ont également été réalisés. La méthode utilisée préconise une dilution au 20^{ème} de la solution concentrée à 3 mg/ml dans 8 M d'urée dans le tampon de renaturation, contenant un ratio en glutathionnes de 10 avec GSH/GSSG = 5/0.5 (mM). Après dilution rapide, la solution contient 150 µM de ¹⁵N-protéine et 400 mM d'urée. Selon Clark, la concentration en protéine après dilution rapide doit être comprise entre 10 et 50 µg/ml soit entre 7 and 35 µM (*Clark 1998*). En effet, plus la protéine est diluée moins elle est sensible à l'agrégation lors du repliement. De plus, van der Berg et coll. ont étudiés l'influence de la concentration en glutathionnes sur le rendement de lysozyme correctement replié (*van den Berg et al. 1999*). Une activité enzymatique maximale a été obtenue après 3 h d'incubation en utilisant un tampon de renaturation contenant un ratio de glutathionnes égale à 5 dans les concentrations suivantes 1/0.2 ou 2/0.4 ainsi que 2 M d'urée pour réduire l'agrégation. Nous avons donc essayé de replier le lysozyme recombinant en utilisant les conditions suivantes : 40 µM de protéine dans un tampon de renaturation contenant 2 M d'urée et un ratio de glutathionnes égale à 5 dans les concentrations suivantes 1/0.2. Cependant un précipité blanchâtre a été observé après 4 h d'incubation, ainsi que lors de la concentration de la phase soluble. Ces observations illustrent un mauvais repliement du lysozyme recombinant. Nous avons également essayé de replier le lysozyme dans ces conditions mais en dialysant la solution contre un gradient d'urée au lieu d'effectuer une dilution rapide qui est une méthode assez drastique et difficile à reproduire. Cependant, à nouveau, l'ensemble du lysozyme a précipité dans le boudin de dialyse. Suite à ces échecs, nous avons contacté notre collaborateur H. Schwalbe qui nous a confirmé la sensibilité de cette étape et nous a aimablement fournit 5 mg de ¹⁵N-lysozyme correctement replié.

1.3. Préparation des solutions protéiques

Les solutions protéiques ont été obtenues par resolubilisation de poudres pures de protéines dans des tampons Tris-HCl de concentrations comprises entre 10 et 30 mM et contenant des concentrations variables en NaCl (15 à 100 mM). Le pH des tampons a été ajusté au pH d'étude en utilisant des solutions 1 M HCl et NaOH.

Avant utilisation, les tampons étaient filtrés sur membranes 0.02 µm (Durapore®, Millipore, France) et les solutions protéiques filtrées avec des filtres seringues stériles de 0.2 µm (membrane acétate de cellulose, distribués par Dustcher).

La concentration des solutions protéiques est vérifiée en mesurant l'absorbance (densité optique) à 280 nm (DO_{280nm}) sur un spectrophotomètre U-3010, Hitachi, France. Les solutions placées dans une cuve en quartz (chemin optique de 1 cm), étaient diluées dans le tampon d'étude pour être dans la gamme de linéarité : absorbance à 280 nm comprise entre 0.1 et 1. La concentration (mol.L^{-1}) en protéine était calculée selon la formule suivante (loi de Beer-Lambert) :

$$C = \frac{DO_{280nm} \cdot d}{\epsilon \cdot l \cdot M_w}$$

avec DO_{280nm} l'absorbance à 280 nm, d le facteur de dilution, ϵ le coefficient d'extinction ($\text{L.g}^{-1}.\text{cm}^{-1}$), l le chemin optique (cm) et M_w la masse molaire de la protéine (g.mol^{-1}).

Les masses molaires et coefficients d'extinction molaires des protéines sont donnés dans le Tableau II-2.

	M_w (g.mol^{-1})	M_w (g.mol^{-1}) ^{15}N -protéine	ϵ ($\text{L.g}^{-1}.\text{cm}^{-1}$)
α -lactalbumine	14 178	14 338	2.01
lysozyme	14 305	14 496	2.64

Tableau II-2 : Masses molaires et coefficients d'extinction des protéines naturelles et des protéines marquée à l'azote 15.

2. Méthodes

2.1. Obtention des microsphères et quantification de la proportion de protéines assemblées

Les suspensions de microsphères utilisées ont été obtenues par incubation pendant 20 à 30 minutes à 45°C de mélanges équimolaires de solutions d'apo α -lactalbumine et de lysozyme préparées dans un tampon Tris-HCl/NaCl à pH 7.5, préalablement chauffées à 45°C.

La proportion de protéines assemblées a été déterminée après centrifugation des suspensions à 15 000 g pendant 30 minutes à température ambiante (centrifugeuse eppendorf 5417C, Eppendorf, France). L'absorbance à 280 nm du surnageant (protéines libres) a été comparée à l'absorbance théorique du mélange sans interaction : % protéines solubles = DO_{280nm} du surnageant / DO_{280nm} théorique, avec DO_{280nm} théorique = $(1/2) (DO_{280nm}$ solution apo α -lactalbumine + DO_{280nm} lysozyme). La proportion de protéines assemblées a ensuite été obtenue par différence (% protéines assemblées = 100 - % protéines solubles).

2.2. Turbidité des solutions

La turbidité ne dépend pas de la concentration mais dépend de la taille et du nombre des particules et renseigne donc sur la formation de particules.

La turbidité des solutions lors du mélange équimolaire des protéines a été obtenue en mesurant l'absorbance à 600 nm sur un spectrophotomètre U-3010, Hitachi, France. La turbidité (τ , cm^{-1}) est reliée à cette mesure selon la formule suivante avec l , le chemin optique (cm):

$$\tau = \frac{2.303 * DO_{600nm}}{l}$$

2.3. Microscopie optique

Les observations en microscopie à contraste de phase ont été réalisées à l'aide d'un microscope Axiovert 200 (Zeiss, France) équipé d'un appareil photographique (AxioCam MRm, Zeiss, France). Les images ont été acquises à température ambiante avec l'objectif x63 (immersion à huile), immédiatement après dépôt de 5 μ l de suspension entre lame et lamelle.

2.4. Microscopie confocale à balayage laser (CLSM)

La microscopie confocale à balayage laser a été utilisée pour observer les particules sub-micrométriques et les objets supramoléculaires formés par assemblage d'apo α -lactalbumine et de lysozyme. Les observations ont été réalisées à l'aide d'un microscope Leica TCS-SP2 (Leica Microsystems Heidelberg, Allemagne) équipé d'un système d'imagerie confocale et d'un laser hélium/néon émettant à 543 nm. L'appareil a été utilisé en mode fluorescence ; la fluorescence était détectée par un photomultiplicateur. Les images ont été obtenues avec l'objectif x63 (immersion à huile) (HCX PL APO) avec une résolution théorique à 0.3 μ m dans le plan xy.

Pour ces expériences, les protéines utilisées ont été marquées avec la sonde fluorescente rhodamine B isothiocyanate selon la méthode suivante. 100 μ l d'une solution concentrée de rhodamine préparée dans du diméthylsulfoxyde à 1g.L⁻¹ étaient ajoutés aux solutions d'apo α -lactalbumine et de lysozyme. Le pontage covalent était effectué par incubation à température ambiante pendant 3 h. Les solutions de protéines marquées étaient ensuite dialysées contre du tampon 10 mM Tris-HCl, pH 7 contenant 0.6 mM NaCl puis contre de l'eau distillée à l'aide d'une membrane de dialyse présentant un seuil de coupure de 6-8000 Da. Après dialyse, les solutions étaient centrifugées à 12 000 g pendant 30 minutes. Le surnageant contenant les protéines marquées était prélevé et lyophilisé.

2.5. Fluorescence intrinsèque

La fluorescence intrinsèque des protéines permet d'évaluer l'état de repliement des protéines. La sonde de fluorescence intrinsèque est le groupement indole des résidus tryptophanes qui émet de la fluorescence entre 300 et 390 nm lorsqu'il est excité à 280 nm. Par rapport à la longueur d'onde maximale d'émission de fluorescence (λ_{\max}) d'une protéine dans sa conformation native, un déplacement de λ_{\max} vers le bleu est observé lorsque l'hydrophobicité de l'environnement des résidus tryptophanes augmente. Au contraire, un déplacement de λ_{\max} vers le rouge illustre une diminution de l'hydrophobicité de l'environnement des résidus tryptophanes.

La Figure II-8 illustre la variation du λ_{\max} en fonction de l'environnement des résidus tryptophane. A 20°C, l'holo α -lactalbumine est dans sa conformation native et les résidus tryptophanes sont enfouis dans le cœur hydrophobe de la protéine, le λ_{\max} est de 329 nm. Lorsque la protéine est dans un état partiellement déplié, tel que l'état molten globule obtenu à pH neutre par dénaturation thermique (45°C) de l'apo α -lactalbumine, les résidus tryptophanes sont partiellement exposés en surface et accessibles au solvant aqueux, le λ_{\max} est alors de 342 nm.

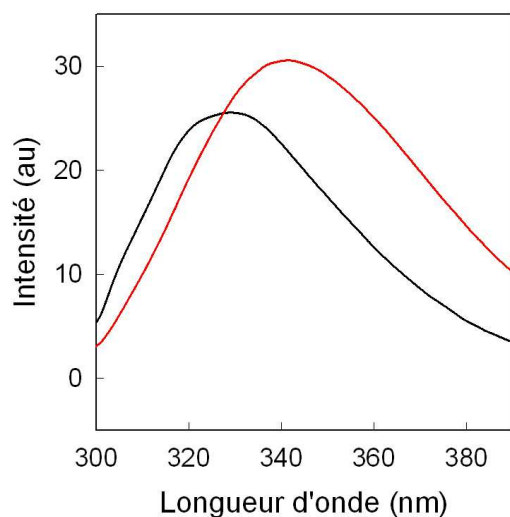


Figure II-8 : Spectres d'émission de fluorescence de solutions à 25 nM d'holo α -lactalbumine à 20°C (noir) et de l'apo α -lactalbumine à 45°C (rouge) dans 10 mM Tris-HCl pH 7.5.

Les spectres d'émission de fluorescence intrinsèque ont été enregistrés sur un spectromètre de fluorescence Jasco FP-6500. La longueur d'onde d'excitation était de 280 nm (avec une largeur de bande de 3 nm) et le spectre d'émission était détecté à 90° entre 300 et 390 nm. Toutes les solutions étaient diluées à 25 ou 50 nM de concentration totale en protéines et placées sous agitation magnétique pour les mesures.

Afin de quantifier la constante de dissociation du calcium pour l' α -lactalbumine, des mesures ont été réalisées à pH 7.5 et pH 4 après ajouts successifs de calcium à une solution d'apo α -lactalbumine à 25 μ M. Le facteur A permet de quantifier l'évolution du spectre de fluorescence, il est calculé par :

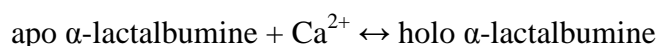
$$A = \frac{I_{320nm}}{I_{350nm}}$$

où I_{320nm} et I_{350nm} sont les valeurs d'intensité de fluorescence à 320 et 350 nm.

Le facteur A a ensuite été normalisé par rapport aux valeurs obtenues pour l'apo α -lactalbumine, A_{apoLAC} et l'holo α -lactalbumine, $A_{holoLAC}$:

$$A_{norm} = \frac{A - A_{apoLAC}}{A_{holoLAC} - A_{apoLAC}}$$

Afin de déterminer la constante de dissociation du calcium pour l' α -lactalbumine, l'évolution en fonction du rapport molaire $[Ca^{2+}]/[apoLAC]$ a été modélisée par une équation du second degré caractéristique de l'équilibre simple :



2.6. Dichroïsme circulaire

2.6.1. Principe

Les protéines absorbent différemment la lumière selon que celle-ci soit de polarisation gauche ou droite. Les protéines présentent donc un dichroïsme circulaire.

Dans l'UV lointain (190-250 nm), le signal renseigne sur la structure secondaire de la protéine; des minima d'ellipticité à certaines longueurs d'onde sont caractéristiques des régions structurées en hélice α , en feuillet β et en pelote statistique (Tableau II-3). Dans l'UV proche (250-320 nm), le dichroïsme indique la mobilité des chaînes latérales aromatiques (tryptophane, phénylalanine, tyrosine). La présence d'un signal indique une mobilité réduite de celles-ci et est caractéristique d'une protéine avec une structure tertiaire stable. Les spectres de dichroïsme circulaire renseignent donc sur l'état conformationnel de la protéine.

Structure secondaire	Longueur d'onde (nm) du minimum d'ellipticité
Hélice α	208 et 222
Feuillets β	216
Pelote statistique	200

Tableau II-3 : Longueurs d'onde caractéristiques des éléments de structure secondaire dans l'UV lointain.

2.6.2. Mode opératoire

Le dichroïsme circulaire a été utilisé pour évaluer l'état conformationnel des formes apo et holo de l' α -lactalbumine selon les conditions physicochimiques utilisées.

Les spectres de dichroïsme circulaire étaient obtenus sur un polarimètre Jasco 810 à 20°C et 45°C. Pour ces études, les protéines étaient solubilisées à 0.2 g.L⁻¹ (14 μ M) dans un tampon 10 mM Tris à pH 7.5 ou pH 2.

Les spectres dans l'UV proche étaient acquis dans une cuve en quartz de 3 ml (chemin optique de 1 cm) entre 250 et 320 nm, alors que les spectres dans l'UV lointain étaient acquis dans une cuve en quartz de 0.5 ml (chemin optique de 1 mm) entre 190 et 250 nm. La vitesse de scan était de 50 nm.min⁻¹. Le spectre d'un échantillon était une moyenne de 4 scans dans l'UV lointain et 10 scans dans l'UV proche. L'ellipticité molaire $\theta_{MRW,\lambda}$ (deg.cm².dmol⁻¹) était exprimée par mole d'acides aminés selon la relation :

$$\theta_{MRW,\lambda} = \frac{MRW * \theta_{\lambda}}{10 * l * C} \text{ avec } MRW = \frac{M_w}{N - 1}$$

MRW : masse molaire par acide aminé

M_w : masse molaire en (g.mol⁻¹)

N : nombre d'acide aminé

θ_{λ} : Ellipticité à la longueur d'onde λ (deg)

l : chemin optique (cm)

C : concentration en protéine (g.mL⁻¹)

2.7. Spectroscopie Infrarouge

2.7.1. Principe

La spectroscopie infrarouge permet la quantification des structures secondaires des protéines.

Chaque liaison chimique a une fréquence de vibration caractéristique. On utilise de façon courante le nombre d'onde (ν') en cm^{-1} plutôt que la fréquence (ν), avec $\nu' = 1/\lambda = \nu/c$ (où λ est la longueur d'onde de vibration et c est la vitesse de propagation de l'onde ou célérité). Les bandes d'absorption caractéristiques des vibrations des groupements amides des protéines sont au nombre de 9 (amide A et B et amide I à VII). Les plus utiles pour les études conformationnelles sont les bandes amide I et II situées respectivement entre 1700-1600 et 1600-1500 cm^{-1} .

La bande amide I contient 80% des fréquences de vibrations d'élongation des liaisons C=O de la liaison peptidique (Figure II-9). Elle représente également 10% des fréquences des vibrations de déformation des liaisons N-H et 10% des vibrations d'élongation des liaisons C-N de la liaison peptidique. Puisque ces groupements peptidiques sont impliqués dans des liaisons hydrogènes qui stabilisent les structures secondaires, l'intensité et la position de la bande I renseigne sur la quantité de structure secondaire. Cette bande est composée de plusieurs composantes se chevauchant et représentant chacune un type de structure secondaire. Des traitements mathématiques de la bande amide I, tels que sa déconvolution ou sa dérivée seconde, permettent de séparer ces composantes. Les nombres d'onde caractéristiques de chaque type de structure secondaire contenu dans la bande amide I sont listés dans le Tableau II-4. Ces fréquences propres peuvent varier d'une protéine à l'autre ainsi que pour différentes conformations d'une même protéine.

La bande amide II se situe entre 1600 et 1500 cm^{-1} et représente 60% des vibrations de courbure des liaisons N-H (et 40% des vibrations d'élongation des liaisons C-N). Elle peut aussi être décomposée en fonction des structures secondaires présentes mais n'est pas un bon indicateur pour leur quantification. Cependant cette bande est très sensible au degré de deutération des protéines et se déplace de ~1550 à ~1450 cm^{-1} (N-D : amide II') lorsque celui-ci augmente.

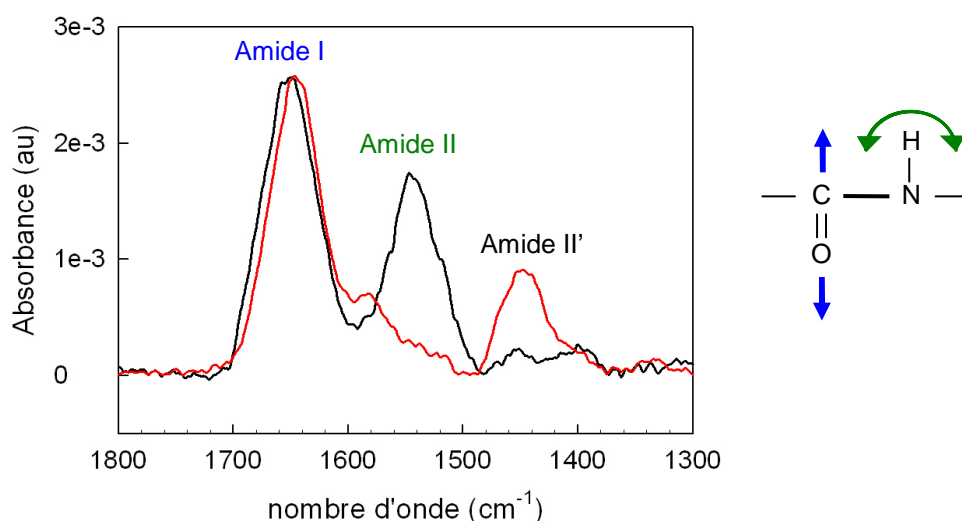


Figure II-9 : Spectre d'absorption infrarouge (mode ATR) d'une solution de lysozyme à 0.5 mM dans un tampon 10 mM Tris-HCl/H₂O, pH 7.5 (noir) et dans un tampon 10 mM Tris-HCl/D₂O, pD 7.9 (rouge). La bande amide I correspond aux vibrations des groupements carbonyles de la liaison peptidique et la composante à 1575 cm⁻¹ correspond aux groupements carbonyles des chaînes latérales des acides aminés aspartate et glutamate. Les bandes amides II et II' correspondent respectivement aux vibrations de déformation des groupements amides hydrogénés et deutérés.

Nombre d'onde (cm ⁻¹)	Structure secondaire
1621-1640	Brins β
1641-1647	Régions non structurées
1651-1657	Hélice α
1658-1671	Coudes
1671-1679	Brins β
1681-1696	Coudes

Tableau II-4 : Nombre d'onde caractéristique de chaque type de structure secondaire.

Dans le cas d'un mélange protéique, l'utilisation d'une protéine marquée au carbone 13 permet de distinguer les deux protéines en mélange et de pouvoir attribuer les structures secondaires de chacune d'entre elles. En effet la bande correspondante au stretching des groupements C=O apparaît à 1650 cm⁻¹, alors que celle des groupements ¹³C=O apparaît à 1600 cm⁻¹.

2.7.2. Montage expérimental

Deux modes d'acquisition sont possibles en spectroscopie infrarouge : le mode par transmission et celui par réflexion (Figure II-10).

En mode transmission, l'échantillon (60 μ l) est déposé entre deux fenêtres de fluorure de calcium séparées par un espaceur de 100 nm. Le dispositif est hermétiquement maintenu dans le porte échantillon (pas-de-vis) qui est placé dans la cellule de mesure où circule de l'air sec afin de maintenir une atmosphère peu chargée en eau. L'installation disponible au laboratoire permet un contrôle en température de l'échantillon. Le faisceau incident traverse l'échantillon et les éléments de structure secondaire présents absorbent une partie de son énergie. Le signal collecté en sortie est comparé au signal initial et renseigne ainsi sur les éléments de structure secondaire présents dans l'échantillon.

En mode réflexion (ou ATR pour Attenuated Total Reflection), une goutte de solution (~10 μ l) est placée sur un cristal de germanium (ou diamant). Un couvercle hermétiquement maintenu par une presse permet de protéger le système de l'évaporation. Le faisceau infrarouge incident est projeté sous le cristal et réfléchi par réflexion dans celui-ci. Une partie des ondes diffuse dans la solution, ce sont les ondes évanescentes. Le signal collecté en sortie est comparé au signal initial et renseigne ainsi sur les éléments de structure secondaire présents dans l'échantillon.

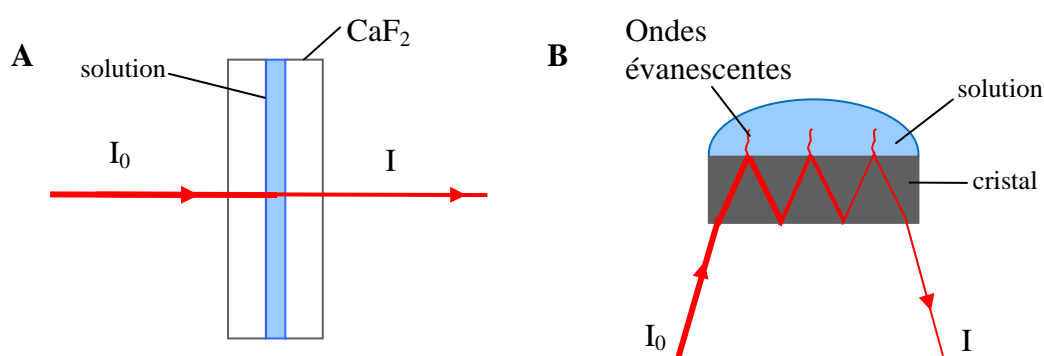


Figure II-10 : Représentation schématique des montages expérimentaux de spectroscopie infrarouge opérants en mode transmission (A) et en mode réflexion (B).

2.7.3. Mode opératoire

Les changements structuraux ont été quantifiés par comparaison de la structure secondaire des protéines assemblées avec celle des protéines individuelles.

Les molécules d'eau absorbant vers 1450 cm^{-1} , il est nécessaire de travailler dans un solvant deutéré pour s'affranchir de ce signal. Le potentiel deutérium correspond à $\text{pD} = \text{pH} + 0.4$. D'autre part, pour éviter le recouvrement de la bande amide I avec celle des groupements N-H, il est préférable de travailler avec des protéines deutérées (bande N-H déplacée à 1450 cm^{-1} pour N-D). La poudre d'apo α -lactalbumine hydrogénée est solubilisée dans un de l'eau lourde et incubée 1 h à température ambiante puis lyophilisée. Ce traitement est reproduit trois fois. Pour le lysozyme ces mêmes trois cycles sont réalisés, en incubant la solution 1 h à 50°C .

Des mesures par réflexion ont été réalisées à 20°C sur un spectromètre PerkinElmer – spectrum 100, équipée d'une source ATR Pike Miracle (PerkinElmer Inc, France). Les spectres résultaient de l'acquisition de 1000 scans à 1cm.s^{-1} .

Les spectres infrarouge ont été enregistrés pour des solutions protéiques pures d'apo α -lactalbumine et de lysozyme deutérées à 0.5 mM dans 10 mM Tris-HCl/D₂O à pD 7.9 et pour une suspension de microsphères obtenue par incubation à 45°C pendant 20 minutes d'un mélange équimolaire à 0.5 mM de concentration totale en protéines.

Les spectres obtenus ont été analysés avec le logiciel d'analyse de spectre Jasco (Spectra Analysis, Version 1.54.00, Jasco Corporation, France). Les dérivées secondes ont été calculées en utilisant la dérivée seconde de Savitzky-Golay (9 points) et les spectres ont été déconvolués avec une largeur de bande de 30 nm^{-1} .

Le spectre infrarouge de la suspension de microsphères a été comparé au spectre construit en sommant les spectres obtenus pour chacune des protéines individuelles. Les composantes contenues dans les bandes amides I correspondantes ont été séparées en calculant la dérivée seconde des spectres et leur déconvoluée. Le spectre de différence (spectre de la suspension de microsphères - spectre construit) permet également d'accentuer les éventuelles différences entre les spectres de la suspension de microsphères et le spectre construit.

La quantification des modifications de structure secondaire par spectroscopie infrarouge a également été envisagée en mode transmission car l'installation permet un contrôle en température de l'échantillon. Ainsi la comparaison des signaux obtenus à 45°C et à 20°C pour une suspension de microsphères (formées à 45°C) permettrait d'évaluer la réversibilité des changements structuraux liés à la température.

Les mesures en mode transmission ont été réalisées sur un spectromètre infra-rouge IR-Prestige- 21 Shimadzu, équipé d'un porte échantillon thermostaté. Une fois la ligne de base enregistrée sur le tampon (signal de vapeur d'eau), des spectres de solutions protéiques étaient enregistrés toutes les 15 minutes jusqu'à stabilisation du signal. Les spectres résultaient de l'acquisition de 100 scans à 1cm.s^{-1} .

Pour tester la faisabilité de cette expérience, les spectres d'apo α -lactalbumine (0.5 mM dans 10 mM Tris-HCl/D₂O, pD 7.9) obtenus à différentes températures (de 20 à 75°C) ont été comparés au spectre obtenu à 20°C pour l'apo α -lactalbumine à pH 2 (0.5 mM dans 10 mM Tris-HCl/D₂O, pD 2) (Figure II-11A). En effet, les modifications de structure secondaire caractéristiques de l'état « molten globule » de l' α -lactalbumine stabilisé à pH acide sont connues (*Troullier et al. 2000*). Ces caractéristiques sont attendues pour les spectres d'apo α -lactalbumine obtenus à pH 7.5 à des températures supérieures à 26°C (température de dénaturation de l'apo α -lactalbumine à pH 7.5).

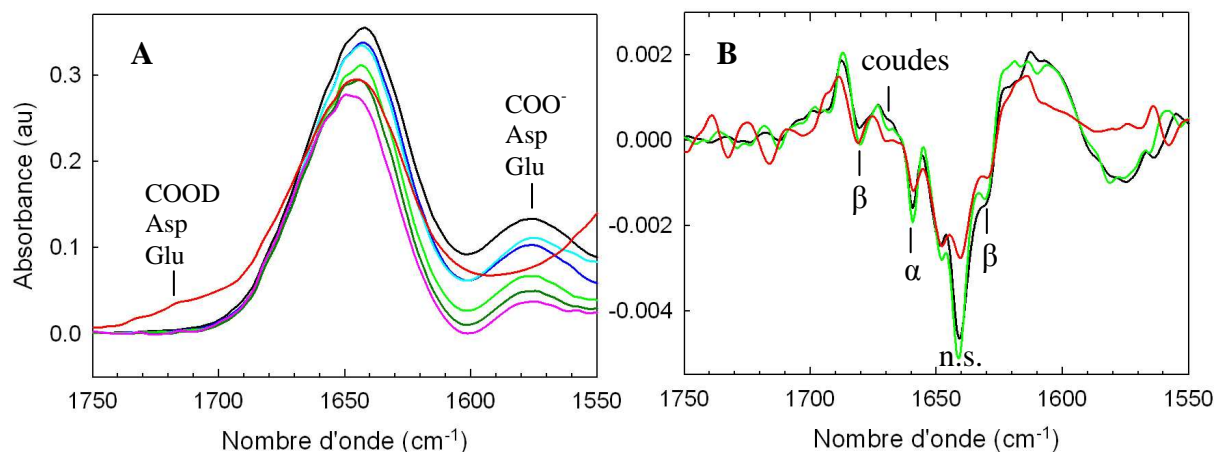


Figure II-11: Spectre infrarouge (mode transmission) d'une solution d'apo α -lactalbumine à 0.5 mM dans 10 mM Tris/HCl-D₂O à pD 7.9 incubé à 20°C (noir), 30°C (bleu foncé), 45°C (bleu clair), 55°C (vert clair), 65°C (vert foncé) et 75°C (rose) et à pD 2 et 20°C (rouge) (A) et dérivées secondes correspondantes (B).

Cependant, il ne semble pas possible de travailler dans des conditions optimales en mode transmission et donc dans des conditions contrôlées en température puisque la comparaison des dérivées de spectres obtenus (Figure II-11B) n'a pas révélé de différences significatives, probablement du fait d'une limite de sensibilité (concentration en protéine de 0.5 mM alors que la concentration optimale est de 1.5 mM en mode transmission).

2.8. Perturbations de déplacements chimiques par 2D-RMN

2.8.1. Principe

La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire bidimensionnelle hétéronucléaire (^1H - ^{15}N RMN) permet d'obtenir des informations structurales à l'échelle du résidu. En effet, une protéine marquée à l'azote 15 est caractérisée par un spectre RMN ^1H - ^{15}N corrélant les déplacements chimiques des atomes d'azote 15 aux déplacements chimiques des protons amide covalamment liés (couplage scalaire). Le spectre consiste en un nuage de pics appelés pics croisés de corrélation. Ces pics correspondent essentiellement au groupement amide de la liaison peptide et sont donc caractéristiques de chaque acide aminé composant la protéine (à l'exception des prolines qui ne contiennent aucun groupement N-H). Les groupements NH_2 des chaînes latérales des acides aminés basique ainsi que les groupements N-H des résidus tryptophanes sont également présents dans des régions spectrales caractéristiques.

La méthode dite du « chemical shift mapping » consiste à quantifier les perturbations de déplacements chimiques engendrées par la fixation d'un ligand à une protéine (Figure II-12). Chaque acide aminé est représenté par un pic croisé sur le spectre ^1H - ^{15}N de la protéine marquée à l'azote ^{15}N , dont la position dépend de l'environnement chimique du groupement amide. Lorsqu'un acide aminé est impliqué dans la fixation du ligand, son environnement électronique natif est modifié, ce qui se traduit par le déplacement (ou une diminution de l'intensité) du pic croisé correspondant sur le spectre. Les acides aminés impliqués dans la fixation du ligand sont ensuite cartographiés à la surface de la structure cristallographique de la protéine afin de visualiser le ou les site(s) d'interaction. Ces expériences peuvent être réalisées par l'ajout d'un excès du ligand mais la réalisation d'une titration (ajouts successifs du ligand) permet également de déterminer la constante d'affinité du ligand.

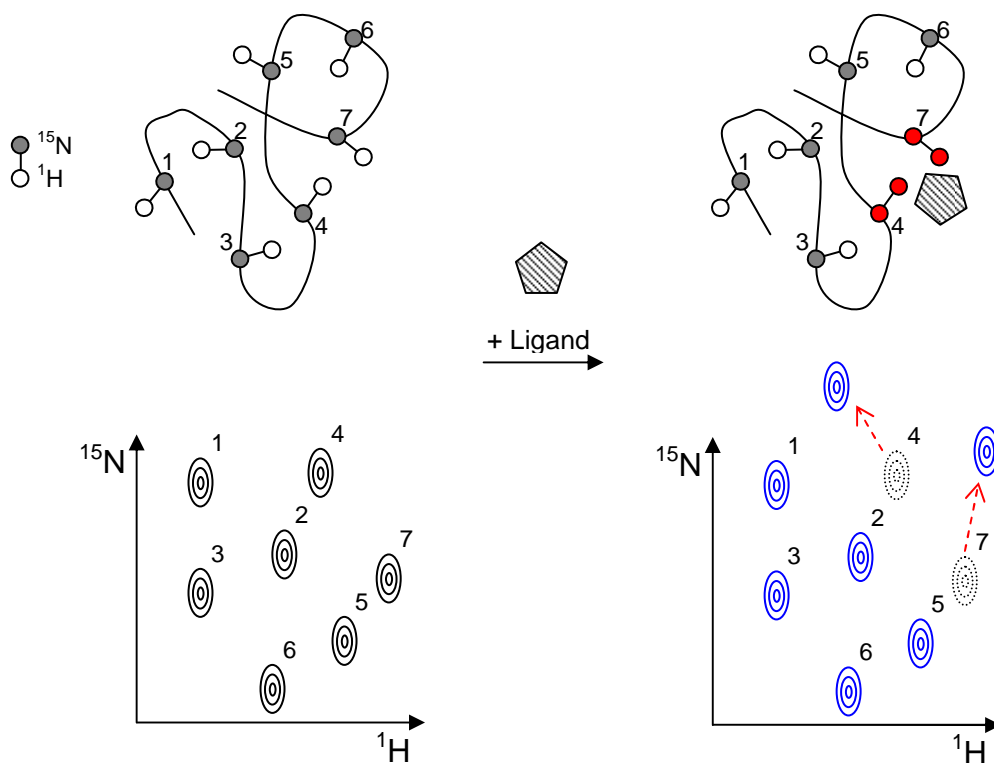


Figure II-12 : Méthode de perturbation de déplacements chimiques dans le cas d'un complexe protéine-ligand en échange rapide. Chaque acide aminé de la protéine marquée à l'azote 15 est représenté par un pic croisé sur le spectre RMN 2D dont la position varie selon l'environnement chimique des atomes. Après addition du ligand, les pics correspondant aux acides aminés impliqués dans l'interaction vont être perturbés. L'identification de ceux-ci permet de cartographier le(s) site(s) de fixation du ligand sur la protéine.

L'interprétation des spectres obtenus dépend de la vitesse d'échange du complexe par rapport à l'échelle de « temps RMN » (Figure II-13). Ce temps est relatif à la variation de fréquence entre le pic correspondant à la forme libre et celui de la forme liée (*Bryant 1983*).

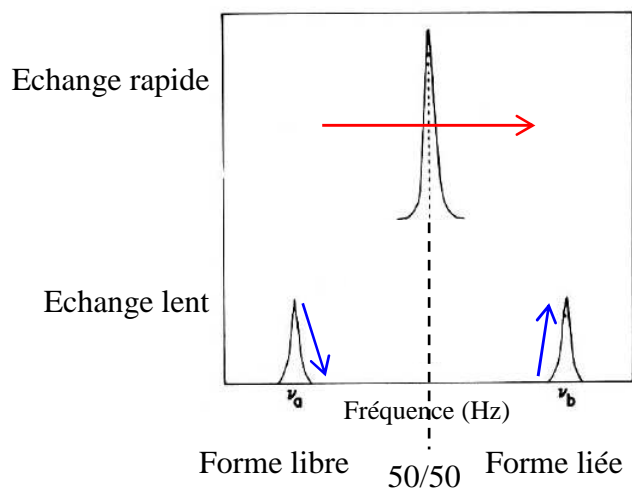


Figure II-13 : Illustration de l'interprétation des résultats obtenus par la méthode de perturbation du shift en fonction du régime d'échange. Schéma adapté de (*Bryant 1983*).

Lorsque la vitesse d'échange entre la forme libre et la forme complexée est très supérieure à la différence de fréquence des deux populations, le complexe est en échange rapide. Dans ce cas, un seul pic est observé par résidu et représente une moyenne des fréquences de chaque forme pondérée en fonction de leur proportion respective. Lors de la titration, ce pic va donc se déplacer de sa position initiale (fréquence de la forme libre) à la position correspondant à 100% de forme liée. Dans le cas d'un échange lent, c'est-à-dire lorsque la vitesse d'échange est inférieure à la différence de fréquence de résonance des formes libre et liée, deux pics distincts sont observés. Lors de la titration, l'intensité du pic correspondant à la forme libre va diminuer alors que celle du pic de la forme liée va augmenter. En conclusion, l'identification des acides aminés impliqués dans l'interaction et la détermination des constantes de dissociation sont réalisées par quantification du déplacement du pic moyen dans le cas d'un échange rapide et par quantification de l'intensité des pics dans le cas d'un échange lent.

La vitesse d'échange dépend de la stabilité du complexe et donc de la constante de dissociation. En général, les complexes de faible affinité ($K_d > 10 \mu\text{M}$) sont en échange rapide alors que les complexes très stables sont en échange lent ($K_d < 0.1 \mu\text{M}$) (*Clarkson and Campbell 2003; Roberts 2003*).

2.8.2. Mode opératoire

L'acquisition de spectres ^1H - ^{15}N HMQC (pour Heteronuclear Multiple Quantum Coherence) a été réalisée sur un spectromètre RMN à haut champ (Varian vnmrs 800) avec une fréquence du proton à 800 MHz équipé d'une cryo-sonde triple résonance (^1H , ^{15}N , ^{13}C), en utilisant la méthode d'acquisition SO-FAST (pour band-Selective Optimized Flip- Angle Short-Transient) (*Schanda and Brutscher 2005*). L'utilisation de champ intense permet de diminuer le temps de relaxation des atomes et la cryosonde permet de réduire le bruit thermique. La méthode d'impulsion SO-FAST permet d'augmenter la sensibilité du signal sur un temps d'acquisition restreint. Dans ces conditions des spectres bien résolus ont été obtenus en 1 h d'acquisition pour une solution à $10 \mu\text{M}$ de ^{15}N -protéine.

Les poudres de ^{15}N - α -lactalbumine et ^{15}N -lysozyme ont été solubilisées dans un tampon 30 mM Tris-HCl, pH 7.5, contenant 15 ou 100 mM de NaCl et 10% v/v D_2O afin de pouvoir calibrer le signal. 600 μl de solution de ^{15}N -protéine à $10 \mu\text{M}$ était placés dans un tube en quartz RMN (5 mm de diamètre, 18 cm de long, Wilmad Lab Glass).

Les surfaces d'interaction de l' α -lactalbumine et du lysozyme dans les hétérodimères holoLAC-LYS et apoLAC-LYS ont été déterminées en réalisant les titrations dans les conditions expérimentales présentées dans le Tableau II-5. Après avoir enregistré le spectre ^1H - ^{15}N HMQC de la ^{15}N -protéine (spectre de référence), un spectre ^1H - ^{15}N HMQC était enregistré après chaque ajout du partenaire non marqué. Les rapports molaires [protéine non marquée]/[^{15}N -protéine] s'échelonnaient de 1 à environ 100 avec une dizaine de point intermédiaires.

	^{15}N -protéine	Protéine ajoutée	T (°C)	Force ionique (mM)
holoLAC-LYS	^{15}N -LYS	holoLAC	45	39
	^{15}N -holoLAC	LYS	45	39
apoLAC-LYS	^{15}N -LYS	apoLAC	45	39
	^{15}N -apoLAC	LYS	45	39
	^{15}N -apoLAC	LYS	20	39
	^{15}N -apoLAC	LYS	20	124
	^{15}N -LYS	apoLAC	20	124

Tableau II-5 : Titrations réalisées pour identifier les acides aminés composant l'interface des hétérodimères holoLAC-LYS et apoLAC-LYS. La surface d'interaction de la protéine ^{15}N est identifiée par ajout successif de son partenaire non marqué.

D'autre part, les titrations « contrôles » d'une protéine marquée par cette même protéine non marquée (^{15}N -holo α -lactalbumine par holo α -lactalbumine et ^{15}N -lysozyme par lysozyme) ont également été réalisées pour s'assurer qu'il n'y a pas homodimérisation des protéines et donc que les variations observées lors des titrations étaient bien spécifiques de la formation des hétérodimères.

Enfin les derniers points de titrations ont été enregistrés après ajout de plus de 400 μM de protéine non marquée. Or à cette concentration la protéine non marquée apparaît sur le spectre par détection des atomes ^{15}N naturellement abondant (1 ‰). La superposition ou le chevauchement partiel de ces pics croisés avec ceux de la ^{15}N -protéine peut induire des erreurs lors de l'interprétation des perturbations de déplacements chimiques. C'est pourquoi des spectres ^1H - ^{15}N HMQC ont été enregistrés pour des solutions concentrées (1 mM) de protéines non marquées afin d'identifier les pic croisés appartenant à la protéine non marquée. Ainsi certains pics croisés de la ^{15}N -protéine qui semblaient se déplacer ont été exclus, ce sont des « faux positifs ».

2.8.3. Traitement des données

Les spectres ont été analysés en utilisant le logiciel NMRview (One Moon Scientific, Inc) (*Johnson and Blevins 1994*). La position des pics (déplacements chimiques dans les dimensions ^1H et ^{15}N) ont été relevées manuellement et ce pour chaque spectre enregistré.

2.8.3.1 Attribution des spectres

Les spectres ^1H - ^{15}H HMQC de référence des ^{15}N -protéines ont été attribués selon les fichiers d'attributions disponibles dans la banque de donnée BMRB (pour Biological Magnetic Resonance Bank, <http://www.bmrwisc.edu/>). Cette banque regroupe l'ensemble des structures protéiques résolues par RMN. Les fichiers d'attributions utilisés ainsi que les conditions expérimentales dans lesquelles ces attributions ont été réalisées sont résumés dans le Tableau II-6.

Protéine	Tampon	pH	T (°C)	Fichier BMRB	Références
^{15}N -LYS	Eau déionisée	3.8	35	n°4943 n°1093	<i>(Buck et al. 1995)</i> <i>(Poznanski et al. 2003)</i> <i>(Redfield and Dobson 1988)</i>
^{15}N -holoLAC	20 mM acétate	6.3	20	n°4332	<i>(Forge et al. 1999)</i>
^{15}N -apoLAC	0.5 M NaCl	7.1	20	n°4811	<i>(Wijesinha-Bettoni et al. 2001)</i>

Tableau II-6: Conditions expérimentales utilisées pour l'attribution des spectres des ^{15}N -protéines et fichiers BMRB correspondants. Dans le cas du lysozyme, Buck et coll. ont publié l'attribution des atomes ^{15}N et les fichiers BMRB n°4943 et 1093 contiennent l'attribution des protons amides ^1H .

Puisque ces attributions ont été réalisées dans des conditions physico-chimiques différentes de nos conditions expérimentales et que la position des pics croisés dépend de celles-ci, nous avons réalisé des dépendances en pH et en température afin d'ajuster ces attributions (excepté pour l'apo α -lactalbumine). Les expériences réalisées sont résumées dans le Tableau II-7.

Protéine	Tampon	pH	T (°C)	attribution
^{15}N -LYS	30 mM Tris, 15 mM NaCl	3.8	20, 25, 35, 38, 42, 45	(pH 3.8, 45°C)
		3.8, 5.5, 6.5, 7.5	45	(pH 7.5, 45°C)
^{15}N -holoLAC	40 mM acétate	6.3	20, 25, 32, 38, 45	(pH 6.3, 45°C)
		6.3, 6.7, 7, 7.5	45	(pH 7.5, 45°C)

Tableau II-7 : Dépendances en pH et en température réalisées pour ajuster l'attribution des spectres de référence.

A la suite des ces dépendances en température et pH, seulement 10% des pic croisés présents sur les spectres ^1H - ^{15}N HMQC de référence n'ont pas été attribués.

La Figure II-14 présente la superposition de spectres obtenus lors des dépendances en pH à 45°C. Quelques exemples de pic croisés présentant des variations de déplacements chimiques significatifs sont annotés sur les spectres. Les variations de déplacements chimiques observées dans le cas du lysozyme sont plus importantes que celles observées pour l'holo α -lactalbumine puisque la gamme de pH étudiée est plus grande.

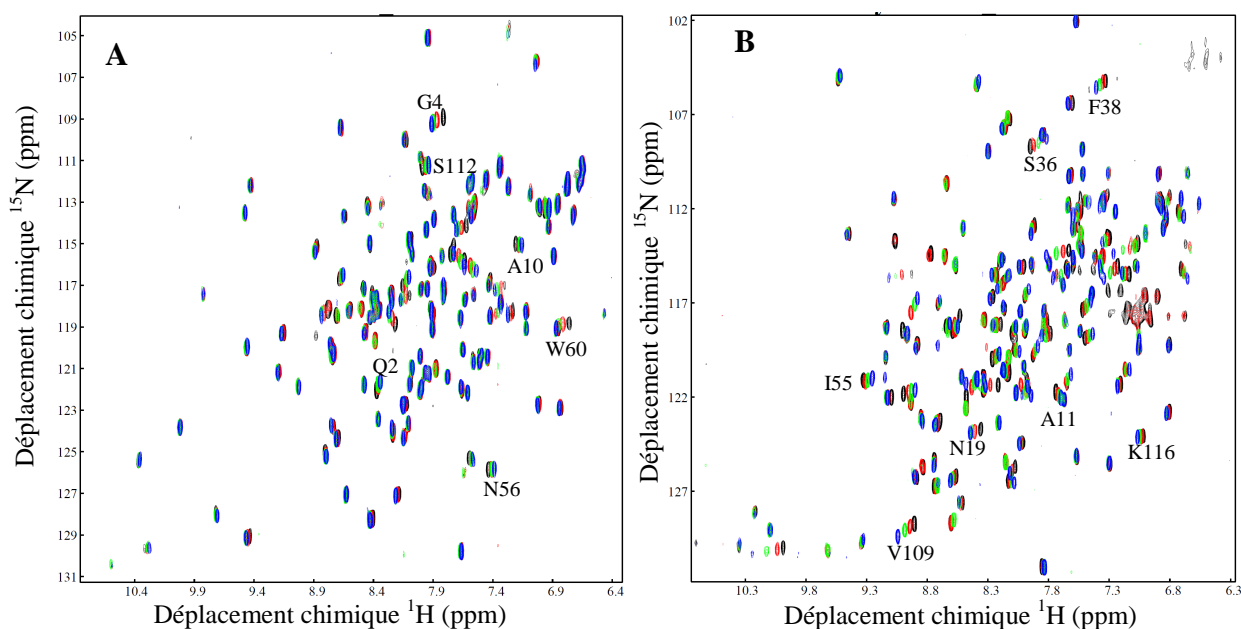


Figure II-14 : Superposition de spectres ^1H - ^{15}N HMQC enregistrés lors des expériences de dépendance en pH de ^{15}N -holo α -lactalbumine (A) : pH 6.3 (noir), pH 6.7 (rouge), pH 7 (vert), pH 7.5 (bleu) et du ^{15}N -lysozyme (B) : pH 3.8 (noir), pH 5.5 (rouge), pH 6.5 (vert), pH 7.5 (bleu).

2.8.3.2 Calcul du déplacement chimique combiné ($\Delta\delta$)

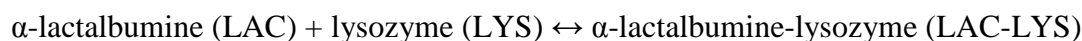
Pour chaque rapport protéique molaire, les variations de déplacements chimiques dans les dimensions ^1H et ^{15}N ont été combinés en calculant, pour chaque acide aminé, une distance euclidienne pondérée par les rapports gyromagnétiques des atomes, selon la formule (Schumann et al. 2007) :

$$\Delta\delta(\text{ppm}) = \sqrt{\left((\Delta\delta\text{H})^2 + \left(\frac{\gamma_{\text{N}}}{\gamma_{\text{H}}} (\Delta\delta\text{N}) \right)^2 \right)}$$

où $\Delta\delta$ est la variation déplacement chimique combiné (ppm), $\Delta\delta\text{H}$ et $\Delta\delta\text{N}$ sont respectivement les variations de déplacements chimiques dans les dimensions proton et azote et γ_{H} et γ_{N} sont les rapports gyromagnétiques des atomes ^1H et ^{15}N , respectivement égaux à $26.752 \cdot 10^7 \text{ rad.T}^{-1}.\text{s}^{-1}$ et $-2.712 \cdot 10^7 \text{ rad.T}^{-1}.\text{s}^{-1}$. Les variations de déplacements chimiques sont calculées par rapport au spectre de référence pour chaque rapport molaire en protéines.

2.8.3.3 Détermination de la constante de dissociation (K_d) et du déplacement chimique à saturation ($\Delta\delta_{\text{max}}$)

Un équilibre simple entre les dimères et les protéines monomériques en solution a été supposé pour déterminer la concentration en dimère :



Cet équilibre est caractérisé par les trois équations suivantes :

$$\begin{cases} K_d = \frac{[\text{LAC}][\text{LYS}]}{[\text{LAC-LYS}]} \\ [\text{LAC}] = [\text{LAC}]_{\text{tot}} - [\text{LAC}]_{\text{LAC-LYS}} \\ [\text{LYS}] = [\text{LYS}]_{\text{tot}} - [\text{LYS}]_{\text{LAC-LYS}} \end{cases}$$

où K_d est la constante de dissociation et $[\text{LAC}]$, $[\text{LYS}]$ et $[\text{LAC-LYS}]$ sont les concentrations des protéines et des dimères à l'équilibre. Les concentrations d' α -lactalbumine et de lysozyme sous forme dimérique sont identiques d'où $[\text{LAC}]_{\text{LAC-LYS}} = [\text{LYS}]_{\text{LAC-LYS}} = [\text{LAC-LYS}]$

A partir de l'équation du second degré obtenue en résolvant ce système, l'équation (1) a été établie. Elle permet d'exprimer la concentration en dimère en fonction des concentrations totales en protéine et de la constante de dissociation.

$$[LAC-LYS] = \frac{1}{2} \left(([LAC]_{tot} + [LYS]_{tot} + Kd) - \sqrt{([LAC]_{tot} + [LYS]_{tot} + Kd)^2 - 4[LAC]_{tot}[LYS]_{tot}} \right) \quad (1)$$

En considérant que l'évolution de la variation du déplacement chimique combiné varie linéairement en fonction de la proportion de protéine sous forme de dimère, on a la relation (2):

$$\Delta\delta(ppm) = \Delta\delta_{max} * \left(\frac{[LAC-LYS]}{[LAC]_{tot}} \right) \quad (2)$$

où $\Delta\delta_{max}$ est la variation de déplacement chimique combiné mesurée lorsque la totalité de la protéine titrée est sous forme dimérique.

En remplaçant l'expression de [LAC-LYS] (1) dans l'équation (2), on obtient l'équation (3) suivante (*Fielding 2007*):

$$\Delta\delta(ppm) = \left(\frac{\Delta\delta_{max}}{2[LAC]_{tot}} \right) \left(([LAC]_{tot} + [LYS]_{tot} + Kd) - \sqrt{([LAC]_{tot} + [LYS]_{tot} + Kd)^2 - 4[LAC]_{tot}[LYS]_{tot}} \right) \quad (3)$$

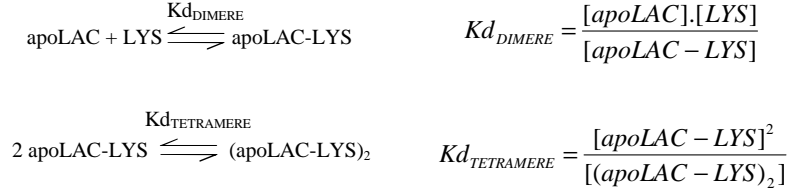
Cette formule a tout d'abord été utilisée afin de déterminer le Kd : les courbes de titration ($\Delta\delta$ en fonction du rapport molaire en protéine) des acides aminés avec une variation de déplacement chimique significative ont été fittées avec cette équation. La valeur du Kd a été fixée dans la formule qui a ensuite été utilisée pour déterminer les $\Delta\delta_{max}$ de chaque acide aminé.

Dans le cas d'une évolution sigmoïdale des variations de déplacement chimique en fonction du rapport molaire en protéine, l'équation de Hill (*Forge et al. 1993*) (4) a été utilisée pour déterminer le Kd et évaluer les déplacements chimiques à saturation.

$$\Delta\delta(ppm) = \frac{\Delta\delta_{max}[L]^n}{Kd^n + [L]^n} \quad (4)$$

où [L] est la concentration en ligand (protéine non marquée ajoutée) et n le coefficient de Hill qui renseigne sur le degré de coopérativité.

Lorsqu'on considère l'association de deux dimères pour former un tétramère selon les équilibres chimiques suivants :



Les évolutions logarithmique et sigmoïdales de déplacement chimique en fonction du rapport molaire en protéine ont été modélisées en utilisant les équations (5) et (6) suivantes :

$$\Delta\delta(\text{ppm}) = \frac{[\text{PL}] + 2[(\text{PL})_2]}{[\text{P}]_t} \cdot \Delta\delta_{\text{max}} \quad (5)$$

$$\Delta\delta(\text{ppm}) = \frac{2[(\text{PL})_2]}{[\text{P}]_t} \cdot \Delta\delta_{\text{max}} \quad (6)$$

où [PL] and [(PL)₂] sont respectivement les concentrations en dimère et tétramère, exprimées en fonction des constants de dissociations correspondantes (Kd_{DIMERE} and Kd_{TETRAMERE}):

$$[\text{PL}] = \frac{[\text{P}] \cdot [\text{L}]}{Kd_{\text{DIMERE}}} \text{ et } [(\text{PL})_2] = \frac{[\text{PL}]^2}{Kd_{\text{TETRAMERE}}} = \frac{[\text{P}]^2 \cdot [\text{L}]^2}{Kd_{\text{DIMERE}}^2 \cdot Kd_{\text{TETRAMERE}}}$$

où [P] and [L] sont respectivement les concentrations libres à l'équilibre en ¹⁵N-protéine et en ligand. [P] est exprimée par l'équation (7) en supposant que la quantité de protéine non marquée sous sa forme liée est négligeable compare à sa concentration totale (i.e. [L]_t = [L]):

$$[\text{P}] = \left(\frac{Kd_{\text{DIMERE}}^2 \cdot Kd_{\text{TETRAMERE}}}{2[\text{L}]_t^2} \right) \left(- \left(1 + \frac{[\text{L}]_t}{Kd_{\text{DIMERE}}} \right) + \sqrt{\left(1 + \frac{[\text{L}]_t}{Kd_{\text{DIMERE}}} \right)^2 + 4[\text{P}]_t \cdot \frac{[\text{L}]_t^2}{Kd_{\text{DIMERE}}^2 \cdot Kd_{\text{TETRAMERE}}} } \right) \quad (7)$$

2.8.3.4 Intensité totale des spectres

L'intensité totale de chaque spectre a également été calculée en sommant l'intensité relevée pour chaque pic croisé. L'évolution de l'intensité au cours des titrations a été quantifiée en normalisant l'intensité totale des spectres obtenus pour chaque rapport molaire en protéines à l'intensité totale du spectre de référence.

2.9. Cinétiques d'échange hydrogène/deutérium

Le principe est le suivant : lorsqu'une protéine est placée dans un solvant deutéré, les protons labiles (protons amides et protons des chaînes latérales liés à un atome électronégatifs) vont échanger avec les deutérons du solvant selon une réaction acide/base. Pour obtenir des informations à l'échelle du résidu, les cinétiques d'échange sont communément suivies par spectrométrie de masse ou par RMN. Dans le cas d'échange proton \rightarrow deutérium, l'utilisation de la RMN consiste à quantifier la diminution de l'intensité des pics croisés (^1H , ^{15}N) au cours des échanges puisque les deutérons ne sont pas détectés (spin 1). Ainsi, l'utilisation de la RMN permet de quantifier la vitesse d'échange de chaque proton amide et donc de chaque acide aminé.

La vitesse d'échange des protons amides dépend de leur accessibilité au solvant et donc de leur localisation dans la structure de la protéine (Figure II-15). Les protons amides des acides aminés impliqués dans la stabilisation des structures secondaires (liaisons hydrogènes) ou enfouis dans le cœur hydrophobe de la protéine ont une vitesse d'échange plus faible que les protons amides des résidus exposés en surface. Le facteur de protection de chaque acide aminé permet de quantifier son accessibilité au solvant et est calculé à partir des vitesses d'échange mesurées.

La méthode des échanges hydrogène/deutérium est une méthode très sensible utilisée pour étudier le repliement des protéines et leur état de structuration (*Forge et al. 1999; Englander 2000*) et les interactions impliquant une protéine, telles que les interactions protéine-membrane (*Chenal et al. 2005; Man et al. 2007*). Les interactions protéiques peuvent mener à la stabilisation de structure secondaire qui résulte en une augmentation du facteur de protection des acides aminés impliqués et/ou à une déstabilisation partielle de structures secondaires (Figure II-16) résultant en une diminution du facteur de protection. Ainsi, la comparaison du profil de protection (facteurs de protection en fonction de la séquence de la protéine) de la protéine en interaction avec celui de la protéine dans sa conformation native (en solution pure) permet d'identifier les zones d'interaction.

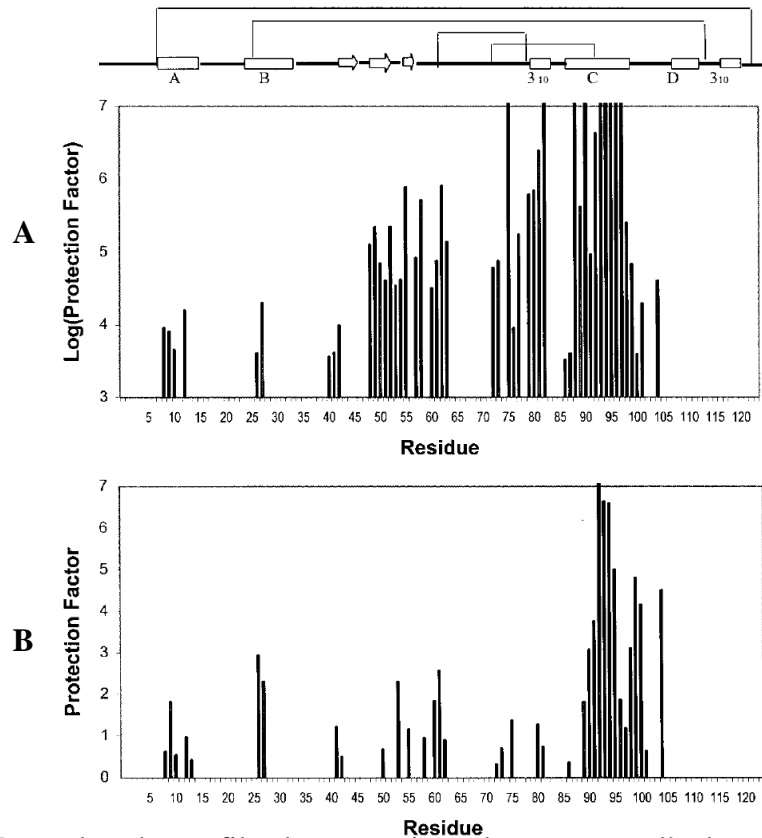


Figure II-15 : Exemples de profils de protection obtenus pour l' α -lactalbumine dans sa conformation native à pH 7.5 (holo α -lactalbumine) (A) et dans sa conformation « molten globule » à pH 2 (B). Les régions présentant le plus haut facteur de protection correspondent aux régions structurées de la protéine (les éléments de structures secondaires sont représentés au-dessus des profils de protection). Lorsque l'apo α -lactalbumine adopte sa conformation molten globule, les fluctuations de sa structure tertiaire augmentent l'accessibilité au solvant des résidus, ce qui se traduit par une diminution de leur facteur de protection. (Forge *et al.* 1999)

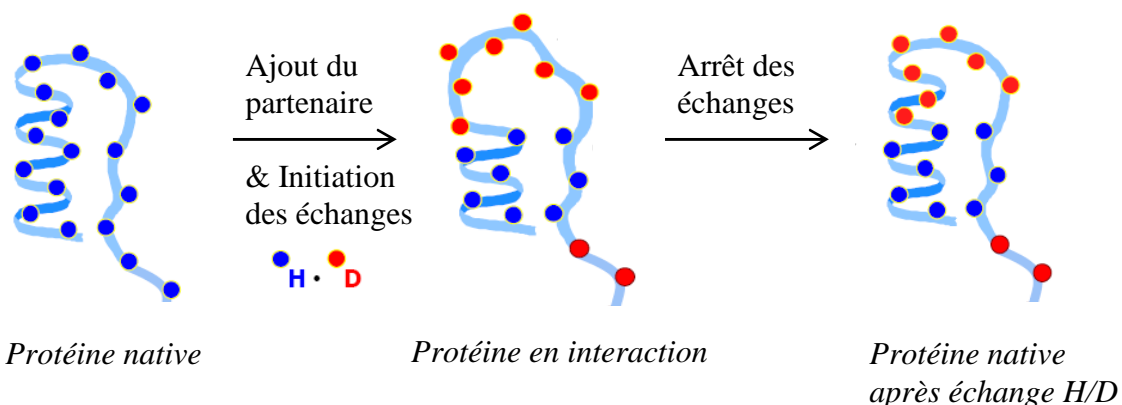


Figure II-16 : La méthode des échanges hydrogène/deutérium permet d'identifier des changements de structure secondaire liés à l'interaction, ici le dépliement local d'une hélice α . Les acides aminés identifiés par comparaison des profils de protection de la protéine native avant et après échanges sont susceptibles d'être impliqués dans l'interaction avec son partenaire.

En général, les échanges sont initiés par dilution de la protéine dans un solvant deutéré et sont stoppés à différents temps par abaissement de la température et/ou du pH. En effet ces deux paramètres permettent de moduler la vitesse d'échange et leur diminution tend à les ralentir (*Bai et al. 1993*). D'autre part, lors de l'arrêt des échanges, il est nécessaire de rétablir la forme native de la protéine pour comparer les profils de protection avant et après échange. De plus l'utilisation de la RMN n'est possible que si la protéine présente une structure tertiaire stable (spectre résolu). En d'autres termes si l'interaction nécessite ou provoque un dépliement partiel de la protéine, il est nécessaire de rétablir la conformation native de la protéine.

Les travaux réalisés dans cette étude ont visé à adapter la méthode des échanges hydrogène/deutérium pour identifier les zones d'interaction au sein des microsphères. Le protocole mis en place est schématisé en Figure II-17. Les échanges sont initiés par dilution au dixième dans un tampon deutéré (10 mM Tris-HCl, 90% v/v D₂O, pD 7.9) d'une suspension de microsphères obtenues dans un tampon hydrogéné (10 mM Tris-HCl/H₂O, pH 7.5). Les échanges sont stoppés par abaissement de la température (20°C → 4°C) et diminution du pH à pH 4. L'ajout de calcium permet de rétablir la forme native de l'apo α -lactalbumine (holo α -lactalbumine). Cette étape consiste également à déstabiliser les microsphères pour retrouver les protéines natives en solution. Une étape de centrifugation précède l'ajout de calcium et l'abaissement du pH afin de séparer les protéines en solution des protéines assemblées en microsphères. La resuspension des culots par ajout d'un tampon 10mM Tris-HCl, 90% v/v D₂O à pH 4 contenant du calcium en quantité suffisante pour rétablir la forme holo de α -lactalbumine n'a cependant pas permis de resolubiliser totalement des protéines. La dernière étape de cette méthode consisterait en la lyophilisation des échantillons avant leur analyse par RMN 2D. L'utilisation d'une protéine marquée à l'azote ¹⁵N permet de distinguer les deux protéines en mélange par l'acquisition de spectres ¹H-¹⁵N HMQC. Pour obtenir les vitesses d'échange de chacune des deux protéines assemblées en microsphères, cette expérience doit donc être réalisée deux fois selon le couple protéine marquée/protéine non marquée.

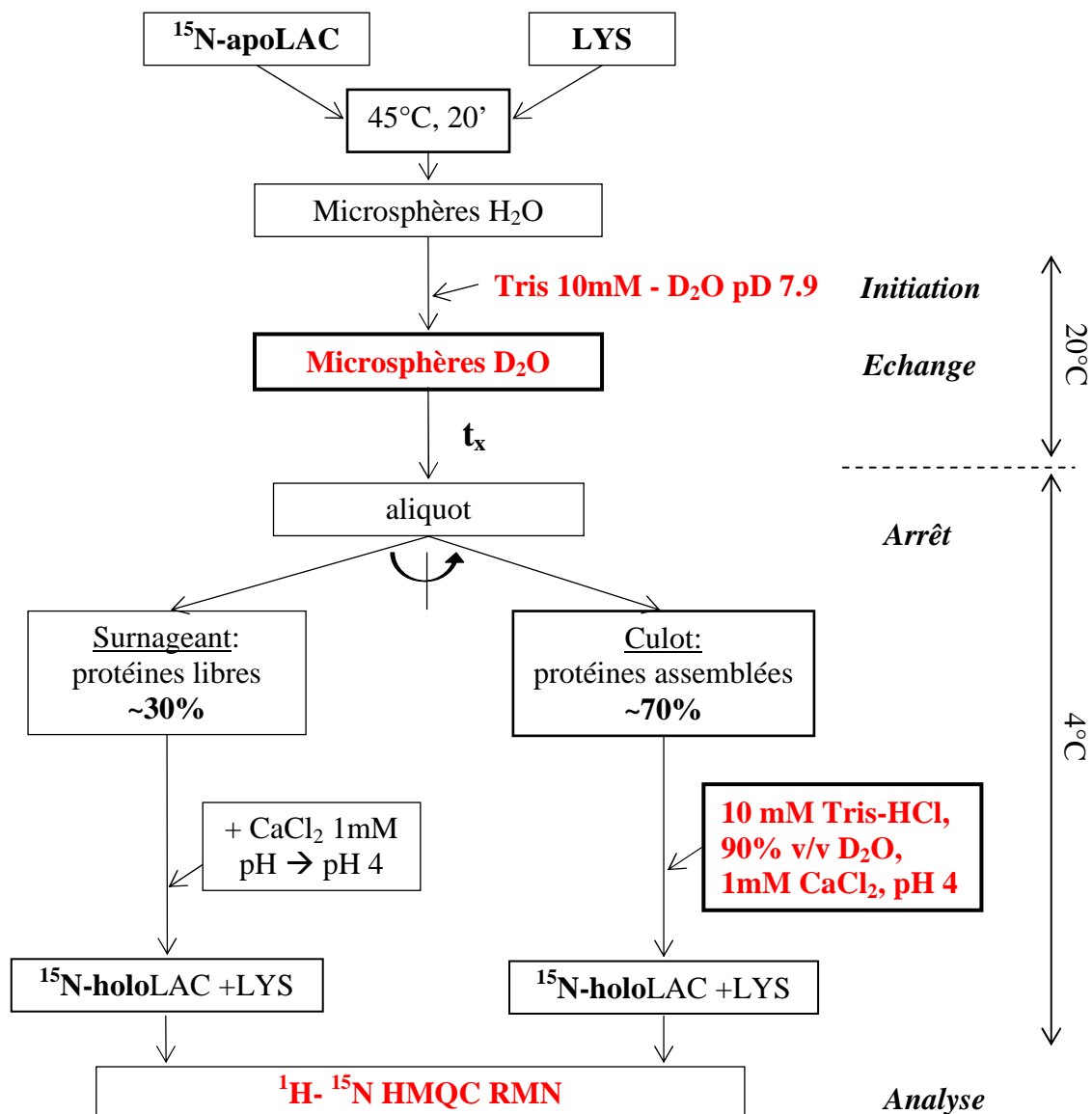


Figure II-17 : Schéma du protocole expérimental envisagé pour appliquer la méthode des cinétiques d'échange hydrogène/deutérium suivies par RMN bidimensionnelle aux microsphères d'apo α -lactalbumine et de lysozyme. Les échanges sont initiés par dilution d'une suspension de microsphères dans un tampon deutéré et stoppés par diminution de la température, ajout de calcium et abaissement du pH à pH 4. Les résidus impliqués dans les interactions au sein des microsphères sont identifiés en utilisant la RMN bidimensionnelle.

2.10. Diffusion de lumière

La diffusion de lumière permet d'accéder à des caractéristiques géométriques des objets formés par assemblage des protéines. La diffusion statique de la lumière renseigne sur la masse molaire moyenne des objets formés, leur rayon de giration et éventuellement le coefficient du Viriel. La diffusion dynamique de la lumière permet d'obtenir une distribution en taille de la suspension en calculant le rayon hydrodynamique des particules.

2.10.1. Diffusion statique de la lumière

Cette technique consiste à mesurer l'intensité de lumière diffusée par une suspension de particules. Des mesures multi-angles permettent d'obtenir la dépendance angulaire de l'intensité diffusée à partir de laquelle les caractéristiques des particules formées peuvent être déduites.

Alors que les particules de petite taille présentent une diffusion isotropique de la lumière (intensité de lumière diffusée identique à tous les angles), les particules de grande taille diffusent davantage aux petits angles (Figure II-18). De plus, la contribution des particules de grande taille est supérieure à celle des particules de petites tailles pour la lumière diffusée détectée aux petits angles. La taille relative des particules est fonction de l'échelle d'observation elle-même dépendante de l'angle d'observation (explications ci-après).

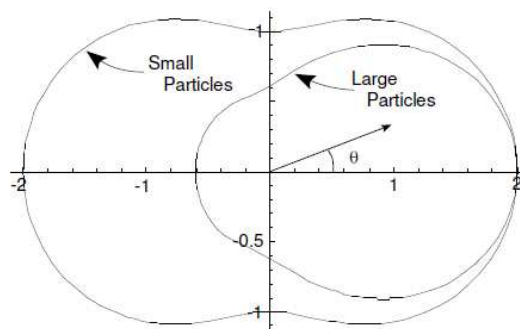


Figure II-18 : Représentation de la diffusion de lumière selon la taille des particules. La diffusion est isotope dans le cas de petite particule et anisotrope dans le cas de particules de grande taille.

Dans le cas d'une diffusion anisotrope de la lumière, l'intensité de lumière diffusée varie selon l'angle d'observation (θ). L'intensité de lumière diffusée renseigne sur la quantité d'interface et est proportionnelle au nombre et à la taille des particules. Elle est proportionnelle à la concentration (C en g.L^{-1}) en protéines agrégées et à la masse molaire des particules (M_w en g.mol^{-1}) selon la relation suivante :

$$I(q) = K.C.M_w.S(q).P(q) \quad (5)$$

NB : dans l'Article 2 la notation $S(q)$ désigne le produit $S(q).P(q)$

L'intensité $I(q)$ est une valeur relative normalisée à l'intensité de lumière diffusée par une solution standard, le toluène dans notre étude (I_{tol}).

$$I(q) = (I_{\text{échantillon}} - I_{\text{solvant}}) / I_{\text{tol}} = I / I_{\text{tol}} \quad (6)$$

L'intensité de lumière diffusée est généralement représentée en fonction du vecteur d'onde de lumière diffuse (q , m^{-1}) qui est relié à l'angle d'observation selon la relation :

$$q = \left(\frac{4\pi * n_s}{\lambda} \right) \cdot \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (7)$$

où n_s est l'indice de réfraction du milieu ($n_s = 1.332$ pour une solution protéique), λ est la longueur d'onde du laser (632 nm).

K est une constante optique caractéristique du système d'étude (L.mol.g^{-2}) et s'exprime par :

$$K = \frac{4\pi^2 n_s^2}{\lambda^4 N_a} \left(\frac{\partial n}{\partial C} \right)^2 \left(\frac{n_{\text{tol}}}{n_s} \right)^2 \frac{1}{R_{\text{tol}}} \quad (8)$$

où N_a est le nombre d'Avogadro, $\frac{\partial n}{\partial C}$ est l'incrément d'indice de réfraction (0.189 mL.g^{-1}) et

R_{tol} est le ratio de Rayleigh (cm^{-1}) de la solution standard de toluène.

$S(q)$ et $P(q)$ sont respectivement le facteur de structure de la suspension et le facteur de forme des particules. L'intensité de lumière diffusée résulte de la lumière diffusée par chacune des particules présentes dans la suspension. Lorsque la concentration en particule est grande, les particules sont proches spatialement. L'intensité diffusée par une particule peut être perçue comme une source lumineuse par une particule voisine qui va alors diffuser davantage de lumière. L'intensité de lumière mesurée résulte donc également des interactions

entre particules qui sont mesurées par le facteur de structure $S(q)$. $S(q)$ est égal à 1 en milieu dilué lorsque ces interactions sont négligeables. Les interférences entre la lumière diffusée par différentes parties d'une même particule sont contenues dans le facteur de forme $P(q)$. $P(q)$ est égale à 1 lorsque celles-ci sont négligeables, c'est-à-dire lorsque l'échelle d'observation est supérieure à la taille des particules (voir domaine aux petits angles dans le paragraphe suivant).

Trois domaines peuvent être distingués lorsque l'évolution de l'intensité de lumière diffusée est représentée en fonction du vecteur d'onde (q) (Figure II-19). L'inverse du vecteur d'onde est représentatif de l'échelle d'observation.

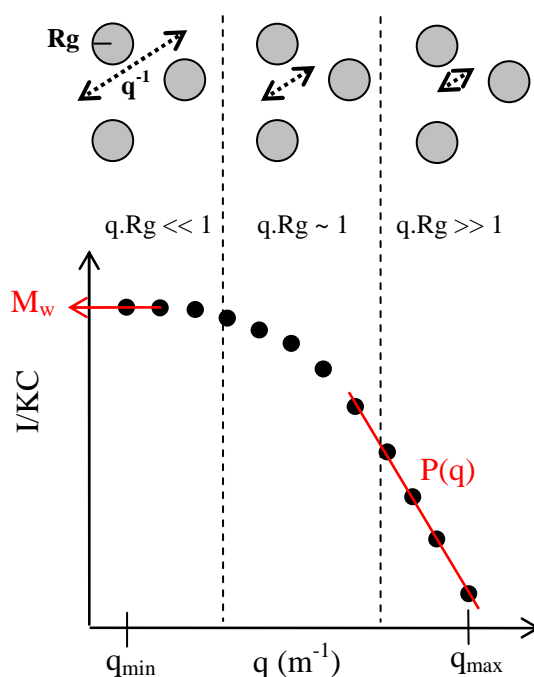


Figure II-19 : Représentation schématique de la dépendance angulaire de l'intensité de lumière diffusion et des différents domaines caractéristiques.

Le domaine aux petits angles (faibles valeurs de q). L'échelle d'observation est plus grande que la taille des particules (R_g), c'est-à-dire $q.R_g \ll 1$. Dans cette situation on a $P(q)=1$. En effet les interférences entre la lumière diffusée par les différentes parties d'une particule sont négligeables. De plus en milieu dilué, on a $S(q)=1$. Dans ces conditions l'intensité de lumière diffusée résulte essentiellement de l'intensité diffusée par chacune des particules indépendamment. Dans ces conditions, l'extrapolation de l'intensité diffusée à $q \rightarrow 0$

permet d'accéder à la masse molaire apparente des particules. En effet l'intensité de lumière diffusée est directement proportionnelle à la concentration et à la masse molaire des particules : $I(q) = K.C.M_w$ (9)

La représentation de I/KC en fonction du vecteur d'onde permet donc d'estimer la masse apparente des agrégats aux petits angles.

Le domaine aux grands angles. L'échelle d'observation est plus petite que la taille des particules (R_g), c'est-à-dire lorsque $q.R_g \gg 1$. L'intensité de lumière diffusée renseigne donc sur la structure interne des particules ($P(q)$) et sur la quantité de protéines agrégées. En effet, l'intensité de lumière diffusée résulte des interférences entre la lumière diffusée par les différentes parties d'une particule. Lorsque la suspension est constituée de particules présentant une structure interne homogène (contraste fort entre solvant et particule) et une surface lisse (interface bien définie), $P(q)$ évolue suivant la loi de Porod et l'intensité de lumière diffusée est proportionnelle à q^{-4} . Lorsque la suspension contient des agrégats fractals, l'intensité de lumière diffusée évolue suivant une loi de puissance proportionnelle à q^{-D_f} , où D_f est la dimension fractale des particules. Le rayon hydrodynamique d'agrégats fractals est relié à leur masse molaire selon $M_w^{-D_f}$.

Le domaine aux angles intermédiaires où l'échelle d'observation est proche de la taille des particules, c'est-à-dire $q.R_g \sim 1$. Dans ces conditions, la dépendance angulaire de l'intensité diffusée permet d'accéder au rayon de giration des particules, selon l'expression :

$$P(q) = 1 + q^2 \cdot \left(\frac{R_g^2}{3} \right) \quad (10)$$

2.10.2. Diffusion dynamique de la lumière

La diffusion dynamique de la lumière permet d'accéder au rayon hydrodynamique (R_h) des particules par l'étude de la relaxation de l'intensité diffusée (*Nobmann et al. 2007*). La diffusion statique de la lumière mesure la valeur temporelle moyenne de l'intensité à différents angles, alors que la diffusion dynamique de la lumière s'intéresse aux fluctuations temporelles de l'intensité à un angle fixe. Du fait du mouvement brownien des particules en solution, l'intensité de lumière diffusée fluctue au cours du temps.

Les fluctuations de l'intensité sont analysées par un corrélateur et la fonction de corrélation résultante permet d'obtenir la distribution en taille des particules présentes en solution. La fonction de corrélation de l'intensité diffusée s'écrit :

$$G_2(t) = \langle I(t).I(t + \Delta t) \rangle \quad (11)$$

Quand $\Delta t \rightarrow 0$, $G(t)$ tend vers la moyenne des intensités au carré $\langle I(t)^2 \rangle$ ($G(t)_{\max}$) alors que quand $\Delta t \rightarrow \infty$, $G(t)$ tend vers le carré des moyennes $\langle I(t) \rangle^2$ ($G(t)_{\min}$). Après normalisation par rapport à $G(t)_{\min}$, la fonction de corrélation décroît selon l'exponentielle (Figure II-20):

$$G_2(t) - 1 = \exp\left(\frac{-t}{\tau}\right) \quad (12)$$

où τ est le temps de corrélation (s). Cette équation n'est valable pour des solutions diluées de particules monodisperses, sphériques et homogène, vérifiant $q.R_g < 1$.

Voici un exemple de corrélogramme à partir duquel est obtenu le temps de corrélation:

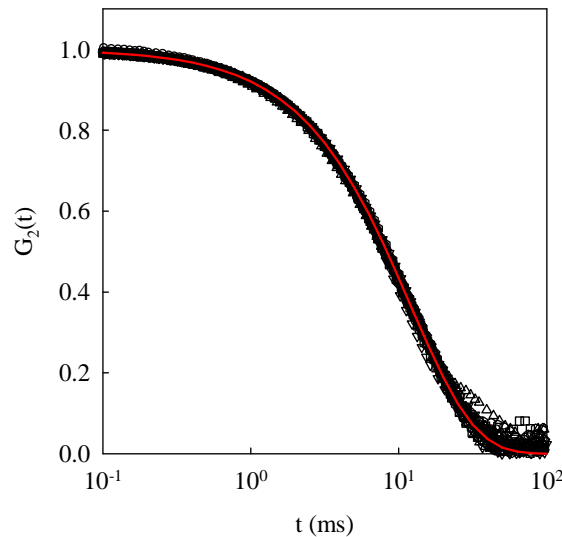


Figure II-20 : Superposition des fonctions d'auto-corrélation de l'intensité obtenues pour un mélange équimolaire à 0.15 mM de protéine totale incubé pendant 10 min à 45°C. Le temps de corrélation a été calculé en fittant les données avec une simple exponentielle: $G_2(t)-1 = \exp(-t/\tau)$ et est égal à 12 ms.

Le temps de corrélation est relié au coefficient de diffusion (D en $\text{m}^2.\text{s}^{-1}$) selon :

$$\tau = \frac{1}{2.D.q^2} \quad (13)$$

Une fois le coefficient de diffusion déterminé, le rayon hydrodynamique est ensuite obtenu en appliquant la relation de Stokes-Einstein:

$$R_h = \frac{k.T}{6\pi.\eta.D} \quad (14)$$

où T est la température absolue (K), k la constante de Boltzmann et η la viscosité de la solution. La viscosité (η , $\text{kg.m}^{-1}.\text{s}^{-1}$) dépend de la température est a été calculée d'après la relation suivante (*Akbarinia et al. 2011*):

$$\eta_{T^\circ\text{C}} = A * 10^{\left(\frac{B}{T-C}\right)} \quad (15)$$

où $A=2.414.10^{-5} \text{ kg.m}^{-1}.\text{s}^{-1}$, $B= 247.8 \text{ K}$, $C=140 \text{ K}$

L'ensemble des paramètres utilisés dans cette étude sont donnés dans le Tableau II-8.

Paramètre	valeur
λ	632 nm
n_s	1.332
n_{tol}	1.495
R_{tol}	$1.35 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^{-1}$
$\partial n / \partial C$	0.189 mL.g^{-1}
$\eta_{25^\circ\text{C}}$	$8.9 \cdot 10^{-4} \text{ kg.m}^{-1}.\text{s}^{-1}$
$\eta_{45^\circ\text{C}}$	$5.9 \cdot 10^{-4} \text{ kg.m}^{-1}.\text{s}^{-1}$
k	$1.3806 \cdot 10^{23} \text{ m}^2.\text{kg.s}^{-2}.\text{K}^{-1}$
N_a	$6.02214 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$

Tableau II-8 : Tableau récapitulatif des différents paramètres optiques et physiques du système d'étude.

2.10.3. Montage expérimental

Les mesures ont été réalisées avec un appareil de diffusion de lumière statique et dynamique (ALV/CGS-3, ALC, Langen, Allemagne) équipé d'un laser He-Ne avec une lumière polarisée verticalement à la longueur d'onde de 632 nm. La gamme de q mesurée est comprise entre 30 et $3.5 \cdot 10^{-3} \text{ nm}^{-1}$. La température était contrôlée par un bain thermostaté.

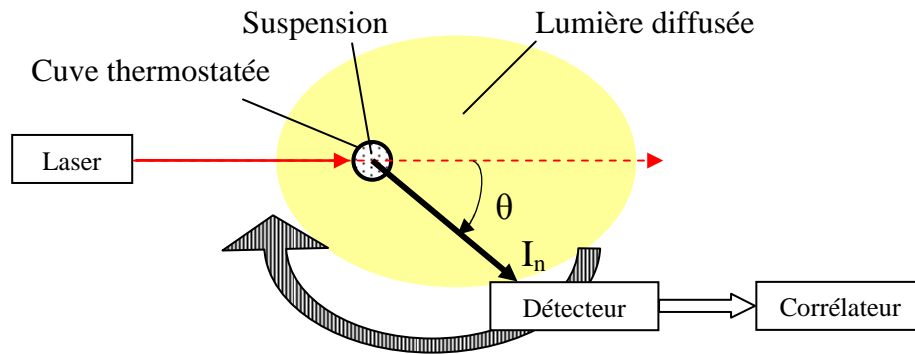


Figure II-21 : Représentation schématique du montage expérimentale de diffusion de lumière.

2.10.4. Modes opératoires

Les tampons et les solutions protéiques pures étaient filtrés sur membranes de $0.02 \mu\text{m}$ et $0.2 \mu\text{m}$ (Anatope), respectivement. Les suspensions ont été obtenues par mélange équimolaire de solutions d'apo α -lactalbumine et de lysozyme préparées dans des tampons à pH 7.5 de force ionique variable (8 à 124 mM) pour des concentrations totales en protéines comprises entre 0.02 et 0.2 mM. Les effets de la température et du temps d'incubation ont été étudiés en travaillant à des températures comprises entre 25 et 45°C et des temps d'incubation allant de 15 min à 2 jours.

2.10.4.1 Mesures multi-angles

Des mesures multi-angle ont été réalisées à 17 angles différents : de 12° à 30° avec un pas de 3° et de 40° à 140° avec un pas de 10° . L'appareil mesure KC/I en fonction de l'angle d'observation. La représentation de I/KC en fonction de q permet d'obtenir la dépendance angulaire de l'intensité de lumière diffusée. Les valeurs de q varient de $2.8 \cdot 10^{-3}$ à $25 \cdot 10^{-3} \text{ nm}^{-1}$, et correspondent à une échelle d'observation (q^{-1}) s'échelonnant de 40 à 400 nm.

Une série de mesures a été réalisée à 0.2 mM de protéines totale et 39 mM de force ionique pour suivre l'évolution de l'intensité diffusée en fonction du temps d'incubation à 45°C .

L'ensemble des autres mesures multi-angles a été réalisé après 15 minutes d'incubation. Les différentes conditions physico-chimiques testées (concentration totale en protéines, force ionique du tampon et température d'incubation) sont résumées dans le Tableau II-9. Les mesures étaient réalisées à 20°C , après dilution des échantillons à $0.01 \mu\text{M}$ de concentration totale en protéines dans les tampons utilisés, afin de stopper l'évolution du système et être dans des conditions diluées où $S(q)=1$.

Concentration totale en protéine (mM)	Force ionique du tampon à pH 7.5 (mM)	Température d'incubation ($^\circ\text{C}$)
0.2, 0.1	39	20, 25, 30, 35, 40, 45
0.2, 0.1, 0.15, 0.1, 0.05	39	25, 45
0.15	8, 39, 54, 124	25, 45

Tableau II-9 : Conditions expérimentales utilisées pour réalisées les mesures multi-angles après 15 minutes d'incubation.

Des mesures de diffusion dynamique de la lumière ont été conjointement réalisées à chaque angle. Les valeurs du R_h obtenues à chaque angle ont été moyennées pour obtenir une valeur dans chaque condition testée. La précision du R_h selon cette méthode est moindre, $\pm 100 \text{ nm}$, car les mesures étaient réalisées automatiquement sur un temps très court (30 s). Sachant que la présence d'une poussière ou d'une particule de grande taille peut invalider la valeur mesurée à un angle donné, la valeur de R_h représente la moyenne d'un nombre variable de valeurs.

2.10.4.2 Cinétiques

Les cinétiques de formation des particules ont été suivies par des mesures d'intensité de lumière diffusée à 20° ($q = 4.6 \cdot 10^6 \text{ m}^{-1}$) réalisées in situ après l'homogénéisation rapide de mélanges équimolaires de solutions d'apo α -lactalbumine et de lysozyme. Le temps écoulé entre le mélange et le début des mesures est estimé à 30 secondes. Ces mesures ont été réalisées, pendant 15 à 30 min, pour des concentrations totales en protéines variables et des tampons à pH 7.5 de force ionique variable (Tableau II-10). Des mesures multi-angles sur 5 angles (20, 30, 60, 90 et 120°) ont également été réalisées après différents temps d'incubation pour évaluer la qualité de la suspension obtenue.

Des mesures de diffusion dynamique de la lumière ont été réalisées à 20° toutes les 30 secondes pendant 10 min lors de l'incubation à 45°C de mélanges protéiques à 0.15 mM et toutes les 150 secondes pendant 4 h lors de l'incubation à 25°C de mélanges protéiques à 0.05 mM. La précision des valeurs moyennes de R_h obtenues est haute du fait de mesures de 30 s répétées sur un temps d'incubation important.

Concentration totale en protéine (mM)	Force ionique du tampon à pH 7.5 (mM)	Température (°C)	Temps
0.2, 0.15, 0.12, 0.1, 0.05, 0.02	39	25, 45	15-30 min
0.15	30, 45, 50, 60, 70	25, 45	15-30 min
0.05	8, 15, 20, 24, 27, 32	45	15-30 min
0.05	39	25	4 h
0.15	39	45	10 min

Tableau II-10 : Conditions expérimentales utilisées pour réalisées les mesures de diffusion de lumière à 20° en temps réel.

III. Résultats

1. Chapitre 1 : Caractérisation moléculaire des interactions à l'échelle des hétérodimères

Ce chapitre est consacré à la caractérisation structurale des hétérodimères d' α -lactalbumine et de lysozyme.

L'hétérodimère composé de l'apo α -lactalbumine et du lysozyme (apoLAC-LYS) est le bloque élémentaire des microsphères. Cette hypothèse a été formulée du fait de l'équimolarité et de la répartition homogène de l'apo α -lactalbumine et du lysozyme dans ces objets supramoléculaires (*Nigen et al. 2007; Nigen et al. 2007*). Cette entité peut être identifiée en mélangeant des solutions protéiques à faible concentration afin d'éviter leur assemblage en objets supramoléculaires (*Nigen et al. 2009*).

Bien que le lysozyme et la forme calcifiée de l' α -lactalbumine (holo α -lactalbumine) ne s'assemblent pas en microsphères dans les conditions favorables à leur formation avec la forme apo, la formation des hétérodimères holoLAC-LYS a également été mise en évidence par des expériences d'anisotropie de fluorescence (*Nigen et al. 2009*) et confirmée par simulation moléculaire (*Persson and Lund 2009*).

A partir des résultats acquis, l'objectif de ce chapitre est de répondre aux questions suivantes :

- les interfaces des hétérodimères apoLAC-LYS et holoLAC-LYS sont-elles différentes ?
- la composition de ces interfaces permet-elle d'expliquer pourquoi seuls les

Les acides aminés composant les interfaces des hétérodimères ont été identifiés par RMN bidimensionnelle en utilisant la méthode du « chemical shift mapping ». L'utilisation de cette méthode a nécessité la production d'une quantité suffisante de protéines recombinantes marquées à l'azote 15. L'obtention des protéines recombinantes s'est avérée plus délicate que prévue. Hormis le temps nécessaire pour la purification, deux obstacles se sont présentés: les très faibles rendements en protéine (≤ 1 mg par litre de culture) et la sensibilité de l'étape du repliement du lysozyme à l'agrégation. Après divers essais d'optimisation, décrits dans la

partie II-1.2, nous avons légèrement augmenté les rendements de purification mais nous ne sommes pas parvenus à obtenir du ^{15}N -lysozyme correctement replié. L'équipe du professeur H. Schwalbe de l'Université Goethe de Frankfurt nous en a fourni une quantité suffisante pour réaliser ces expériences.

Après avoir présenté les domaines d'application de la méthode de « Chemical Shift Mapping », les résultats obtenus dans les conditions dites « standards » pour l'obtention de microsphères (à 45°C dans un tampon 30 mM Tris 15 mM NaCl, pH 7.5), sont présentés sous la forme d'un projet de publication (**Article 1**).

En complément des résultats publiés, nous présenterons également le résultat obtenu par « docking » pour tenter de proposer une structure tridimensionnelle de l'hétérodimère holo α -lactalbumine-lysozyme et les expériences réalisées à 20°C pour chercher à déterminer les résidus de l'apo α -lactalbumine impliqués dans les interactions avec le lysozyme.

Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec Adrien Favier de l'Institut de Biologie Structurale de Grenoble et Nicolas Duraffourg du Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux du CEA de Grenoble. Les simulations moléculaires présentées ont été réalisées par Björn Persson et Mikael Lund de l'Université de Lund, Suède.

1.1. Méthode du « Chemical Shift Mapping » par RMN bidimensionnelle

La RMN est depuis la fin des années 90 une technique largement utilisée pour le criblage de composés actifs et l'identification de ligands de récepteurs protéiques (*Meyer et al. 2003*). Les approches fondées sur l'observation du récepteur comparent les paramètres RMN de celui-ci en absence et en présence de ligand. Dans le cas d'une protéine marquée à l'azote 15, chaque acide aminé, excepté les prolines, sont caractérisés par un pic de corrélation sur son spectre RMN hétéronucléaire (^1H - ^{15}N) couplant les déplacements chimiques des protons amide (^1H) à ceux de l'azote de la liaison peptidique (^{15}N). Les positions de ces pics dépendent de l'environnement chimique des atomes (*Vaynberg and Qin 2006*). Par conséquent, la fixation d'autres molécules provoque des variations sur le spectre RMN de la protéine, c'est-à-dire un déplacement des pics de corrélation correspondants aux acides aminés impliqués dans les interactions.

La méthode qui consiste à identifier les perturbations de déplacements chimiques engendrées par la fixation d'un ligand est appelée la méthode du « Chemical Shift Mapping » (*Clarkson and Campbell 2003*). Cette méthode permet non seulement de cribler les ligands mais également de localiser le site de fixation du ligand à la surface de la protéine, en cartographiant (« mapping ») sur la structure cristallographique de la protéine les acides aminés impliqués dans la fixation du ligand. La RMN bidimensionnelle présente également l'avantage par rapport à d'autres tests d'activité (fluorimétrie, calorimétrie) de cribler des ligands de faible affinité. En effet les déplacements chimiques mesurés sont sensibles à de faibles perturbations et des concentrations élevées en ligand peuvent être utilisées sans réduire le signal puisque seule la protéine marquée à l'azote ^{15}N est détectée. Cette approche nécessite néanmoins la production de protéine enrichie en isotope ^{15}N et ne peut être utilisée pour des protéines de hauts poids moléculaires. Le nombre de pics présents sur le spectre augmente avec le poids moléculaire et ceux-ci ont tendance à se superposer compromettant ainsi l'attribution du spectre.

A titre informatif, il existe également des approches fondées sur l'observation du ligand. L'utilisation de la RMN du proton permet de mesurer les paramètres reflétant la mobilité différentielle du ligand (*Lepre et al. 2004*). Les ligands présentent des temps longs de relaxation et des coefficients de diffusion élevés et, lorsqu'ils sont liés à leur récepteur, les temps de relaxation et coefficients de diffusion diminuent. Ces approches offrent l'avantage de ne pas avoir à produire de protéine enrichie en isotope et ne présentent pas de limite de taille car en général les ligands sont des petites molécules (<500 Da). Cependant elles ne donnent aucune information sur la localisation du site de fixation du ligand sur le récepteur.

Une technique étudiant les relations structure-activité (SAR pour Structure Activity Relationship) par RMN bidimensionnelle est une approche fondée sur l'observation du récepteur pour le développement de ligands de haute affinité (*Shuker et al. 1996*). Ceux-ci sont construits par pontage covalent de deux molécules organiques se fixant sur des sous-unités distinctes du site actif de la protéine. La première application de SAR par RMN a été rapportée dans le cas de la protéine FKBP (protéine liant FK506) (*Shuker et al. 1996*). Lorsque cette protéine fixe l'immunosuppresseur FK506, elle inhibe la calcineurine (phosphatase) et bloque l'activation des lymphocytes (*Liu et al. 1991*). FK506 est un immunosuppresseur puissant utilisé dans le traitement de patients ayant subi une greffe d'organe pour réduire les rejets. Du fait de la toxicité de ce composé, la méthode SAR a été

utilisée pour développer des analogues de FK506. L'utilisation de la méthode du « chemical shift mapping » a permis de sélectionner un dérivé tri-méthoxyphényle de l'acide pipecolinique qui se fixe à FKBP avec une affinité de 2 μM et un dérivé benzanilide optimisé par modifications chimiques (présentant deux groupements hydroxyles en configuration para) qui se fixe sur un site adjacent avec une constante de dissociation d'environ 100 μM . La synthèse de réticulants de taille variable (fonction du nombre de méthylènes ajoutés) pour attacher covalamment ces deux molécules a permis de générer des ligands présentant des affinités de 20 à 230 nM (Figure 1-1).

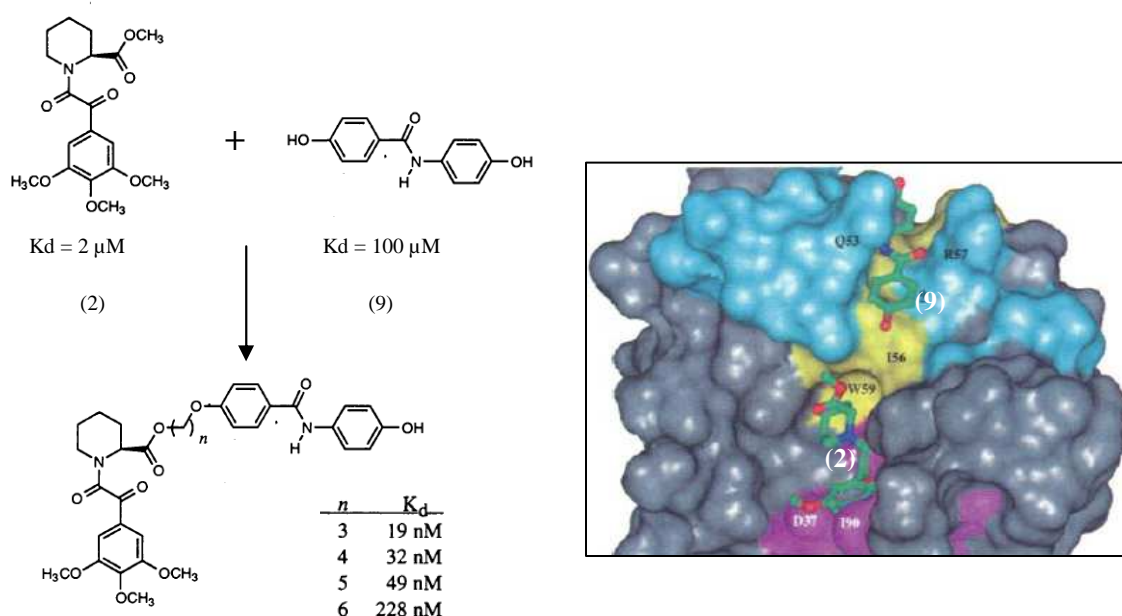


Figure 1-1 : Obtention de ligands de haute affinité (nM) par pontage covalent de deux composés de plus basse affinité identifiés par « Chemical Shift Mapping » : (2) dérivé tri-méthoxyphényle de l'acide pipecolinique (K_d de 2 μM) et (9) un dérivé benzanilide présentant deux groupements hydroxyles en configuration para (K_d de 100 μM). Représentation de la surface de FKBP où les résidus impliqués dans la fixation de (2) et (9) sont respectivement représentés en magenta et cyan. Les résidus représentés en jaune sont impliqués dans la fixation des deux composés. Schéma adapté de (*Shuker et al. 1996*).

Cette méthode a ensuite été appliquée pour le développement de ligands à haute affinité pour d'autres protéines (*Lepre et al. 2004*), telle que les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (*Oltersdorf et al. 2005*). Ainsi, des ligands présentant des affinités de l'ordre du nanomolaire ont été développés par pontage chimique de deux composés présentant des affinités de l'ordre du micromolaire.

Dans le cas d'interactions protéine-protéine, les surfaces d'interaction sont déterminées par titration d'une protéine marquée à l'azote 15 par son partenaire non marqué. Cependant, la taille du complexe formé est un facteur limitant pour appliquer la méthode du « chemical shift mapping ». Lorsque le complexe est formé, l'augmentation de la masse apparente de la protéine marquée induit (i) une augmentation des couplages dipolaires entre protons ce qui résulte en une fuite de l'aimantation et donc une diminution de l'intensité du signal et (ii) une diminution du mouvement rotationnel de la protéine qui résulte en une augmentation de la vitesse de relaxation transversale (**Rule and Hitchens 2006**). Ce deuxième phénomène se traduit par un élargissement des pics de résonance et donc une diminution du signal. Le développement méthodologique des expériences de RMN bidimensionnelle a permis de contourner cette limitation en utilisant une méthode d'acquisition qui optimise la relaxation transverse des atomes (TROSY pour Transverse Relaxation Optimized Spectroscopy) (**Riek et al. 2000**). Cependant, la taille des molécules est toujours limitée par le nombre de pics présents sur le spectre. Une alternative à ce problème est l'utilisation de protéine tronquée pour étudier la fonction d'un domaine de la protéine dans la reconnaissance du ligand (**Morton et al. 1996; Pursglove et al. 2002**).

A titre d'exemple, la méthode du « Chemical Shift Mapping » a été utilisée pour identifier les résidus impliqués dans les interfaces au sein d'homodimères de faible affinité (K_d de quelques millimolaires), tels que celui formé par l'antigène CD2 chez le rat (**Pfuhl et al. 1999**) et le dimère formé en présence de phosphate par une phosphatase de faible poids moléculaire (**Akerud et al. 2002**). Des études ont également caractérisé les interactions protéiques transitoires impliquées dans les systèmes bactériens de phosphorylation. Les surfaces d'interaction de la protéine porteuse du groupement phosphate (HPr) avec le domaine A de l'enzyme membranaire II (IIA) et avec la région N-terminal de l'enzyme I (EIN) ont été déterminées par titration de ^{15}N -HPr par IIA (**Chen et al. 1993; Van Nuland et al. 1993**) et EIN (**Garrett et al. 1997**). L'ubiquitination des protéines met également en jeu un système protéique composé de plusieurs enzymes, en particulier le complexe Mms2/Ubc13 qui se conjugue à l'ubiquitine une fois activée. Les surfaces d'interaction au sein de ce complexe et du complexe conjugué à l'ubiquitine ont été déterminées par le groupe d'Ellison (**McKenna et al. 2001; McKenna et al. 2003; McKenna et al. 2003**). Ces études ont également permis de préciser le rôle de chaque protéine du complexe dans la réaction de transfert de l'ubiquitine. Ces exemples illustrent l'utilité de cette méthode pour caractériser les

interfaces de complexes protéiques transitoires de faible affinité (*Zuiderweg 2002; Vaynberg and Qin 2006*).

Dans notre étude, nous avons donc choisi d'appliquer la méthode du « chemical shift mapping » pour déterminer les surfaces d'interaction au sein des hétérodimères α -lactalbumine-lysozyme. Nous ne sommes pas limités par la taille des complexes car leur poids moléculaire (28 kDa) est relativement faible. D'autre part, les deux protéines ont été largement étudiées et leur structure cristallographique ainsi que l'attribution de leur spectre RMN (^1H , ^{15}N) sont disponibles. La difficulté pour étudier les dimères est la concentration en protéine. En effet, les expériences de RMN nécessitent en général des concentrations de l'ordre du millimolaire alors que les dimères α -lactalbumine-lysozyme sont obtenus en travaillant à des concentrations de l'ordre du micromolaire. Cependant, l'utilisation d'un spectromètre à haut champ (800 MHz) équipé d'une cryosonde et de la méthode d'acquisition So-Fast (*Schanda and Brutscher 2005*) nous a permis d'obtenir des spectres ^1H - ^{15}N HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence) résolus en un temps d'expérience acceptable (1 h) en utilisant 10 μM de protéine marquée à l'azote 15.

1.2. Résumé détaillé de l'article 1

La surface d'interaction de l'holo α -lactalbumine avec le lysozyme et celles du lysozyme avec les formes holo et apo de l' α -lactalbumine ont été déterminées par titration d'une protéine marquée à l'azote 15 par son partenaire non marqué.

La surface d'interaction de l'apo α -lactalbumine avec le lysozyme n'a pu être déterminée car l'apo α -lactalbumine est dans sa conformation « molten globule » à 45°C, ce qui se traduit par un regroupement des pics croisés sur son spectre RMN. Cependant l'expérience réalisée avec l'apo α -lactalbumine marquée semble indiquer que celle-ci reste dans son état molten globule au sein des dimères apoLAC-LYS. Son interaction avec le lysozyme ne semble donc pas la contraindre dans une conformation particulière. D'autre part, les titrations réalisées avec les protéines natives indiquent que la formation des hétérodimères n'implique pas de changement conformationnel important des protéines qui résulterait en des modifications drastiques des spectres RMN. En effet, seuls certains pics croisés sont affectés lors des titrations et les variations de déplacements chimiques sont de faible amplitude.

Les acides aminés de l'holo α -lactalbumine qui interagissent avec le lysozyme sont principalement localisés dans son domaine β . Ceux-ci définissent une région étroite d'interaction à la surface de la protéine. Inversement la surface du lysozyme en interaction avec l'holo α -lactalbumine est plus large et est composée d'acides aminés principalement localisés dans son domaine α .

Des simulations moléculaires réalisées par la méthode du Monte Carlo ont montré l'influence de l'intensité du moment dipolaire sur la géométrie (aire) de la surface d'interaction et l'orientation mutuelle des protéines au sein du dimère holoLAC-LYS. L'intensité du moment dipolaire dépend de la répartition des charges à la surface des protéines. En effet, la répartition hétérogène des charges négatives à la surface de l'holo α -lactalbumine lui confère un moment dipolaire élevé. Inversement, les charges positives sont uniformément réparties à la surface du lysozyme résultant en un moment dipolaire plus faible. Le lysozyme est attiré vers le pôle négatif du moment dipolaire de l'holo α -lactalbumine alors que l'holo α -lactalbumine ne présente pas d'orientation préférentielle à la surface du lysozyme. La comparaison de ces résultats avec ceux obtenus expérimentalement montre une très bonne corrélation. En effet le pôle négatif du moment dipolaire de l'holo α -lactalbumine correspond parfaitement avec sa surface étroite d'interaction et la répartition diffuse de l'holo α -lactalbumine autour du lysozyme coïncide avec la surface d'interaction étendue du lysozyme déterminée expérimentalement. La formation des hétérodimères holoLAC-LYS est donc principalement gouvernée par des attractions électrostatiques mais ne présente pas de spécificité particulière, plusieurs conformations semblent exister pour ce complexe.

Ces titrations nous ont également permis de déterminer les constantes apparentes de dissociation des hétérodimères. Dans le cas du dimère holoLAC-LYS, les résidus de l'holo α -lactalbumine identifiés interagissent avec une constante de dissociation de $320 \pm 50 \mu\text{M}$ alors que dans le cas du lysozyme certains acides aminés interagissent avec une constante de dissociation comparable ($293 \pm 52 \mu\text{M}$) et d'autres présentent une affinité inférieure ($K_d = 725 \pm 185 \mu\text{M}$). Ces faibles constantes de dissociation combinées aux résultats de simulation moléculaire montrent que l'hétérodimère holoLAC-LYS présente les caractéristiques d'un complexe transitoire.

Nous avons également montré que la surface d'interaction du lysozyme avec l'apo α -lactalbumine est similaire à celle déterminée avec la forme holo. La constante de dissociation déterminée à partir de cette expérience ($390 \pm 90 \mu\text{M}$) est également comparable à celle déterminée pour le dimère holoLAC-LYS. Cependant, la surface d'interaction du

lysozyme avec l'apo α -lactalbumine se distingue par la présence de résidus supplémentaires en interaction selon un processus coopératif de plus haute affinité ($K_d = 196 \pm 30 \mu\text{M}$). Ces résidus mettent donc en évidence un deuxième évènement de fixation.

L'apo α -lactalbumine est dans sa conformation molten globule dans les conditions étudiées (45°C) et présente donc une flexibilité importante du fait de l'absence de structure tertiaire stable. Cette flexibilité particulière pourrait expliquer un deuxième évènement de fixation; une fois les premières interactions établies, une adaptation conformationnelle de l'apo α -lactalbumine à la surface du lysozyme résulterait en des interactions secondaires. Cependant cette hypothèse ne permet pas d'expliquer la diminution d'intensité des spectres RMN observée lors la titration du ^{15}N -lysozyme par l'apo α -lactalbumine qui est plus accentuée que celles mesurées lors de la formation du dimère holoLAC-LYS. Alors que la diminution d'intensité est attribuée à l'augmentation de masse apparente de la protéine marquée du fait de la formation des hétérodimères holoLAC-LYS, la diminution supplémentaire observée lors de la formation des dimères apoLAC-LYS a été attribuée à la formation d'oligomères. Les acides aminés du lysozyme réagissant de façon coopérative constituent donc un deuxième site d'interaction pour l'oligomérisation des dimères, c'est-à-dire la formation de tétramère.

Nous avons proposé un modèle de formation des tétramères en supposant que les acides aminés de l'apo α -lactalbumine impliqués dans l'interaction avec le lysozyme étaient identiques à ceux identifiés dans le cas de l'holo α -lactalbumine. Cette hypothèse est raisonnable compte-tenu des similarités observées pour les surfaces d'interactions du lysozyme avec chacune des formes de l' α -lactalbumine. D'autre part, la déplétion en calcium résulte en des charges négatives supplémentaires à la surface de l' α -lactalbumine, qui sont susceptibles d'être engagées dans des interactions électrostatiques secondaires. C'est pourquoi, ce modèle suppose également que le site de fixation du calcium constitue le site de tétramérisation à la surface de l'apo α -lactalbumine. Enfin, la formation des tétramères résulte en la neutralisation de la majorité des charges complémentaires à la surface des protéines. Les interactions hydrophobes, favorisées par l'exposition partielle de patchs hydrophobes à la surface du « molten globule » de l'apo α -lactalbumine, sont alors prépondérantes pour l'assemblage des tétramères en oligomères.

1.3. Article 1

Investigation at residue level of the early steps during the assembly of two proteins into supramolecular objects

Delphine B. Salvatore^{†‡}, Nicolas Duraffourg[†], Adrien Favier[§], Björn A. Persson^{||}, Mikael Lund^{||}, Marie-Madeleine Delage[‡], Robert Silvers[⊥], Harald Schwalbe[⊥], Thomas Croguennec[‡],
Saïd Bouhallab[‡] and Vincent Forge^{†*}

[†]Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux (UMR 5249), CEA-Grenoble, 17, rue des Martyrs, F-38057 Grenoble, France.

[‡]UMR 1253, INRA, Agrocampus Ouest, Science et Technologie du Lait et de l'Oeuf, 65 rue de Saint-Brieuc, F-35000 Rennes, France.

[§]Laboratoire de Résonance Magnétique Nucléaire, Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel, 41, rue Jules Horowitz, F-38027 Grenoble, France.

^{||}Department of Theoretical Chemistry, University of Lund, P.O.B. 124, S-22100 Lund, Sweden.

[⊥]Institute for Organic Chemistry and Chemical Biology, Johann Wolfgang Goethe University, Max-von-Laue-Strasse 7, D-60438 Frankfurt am Main, Germany

*Corresponding author: Vincent Forge

ABSTRACT

Understanding the driving forces governing protein assembly requires the characterization of interactions at molecular level. We focus on two homologous oppositely charged proteins: lysozyme and α -lactalbumin, which can assemble into microspheres. The assembly early steps were characterized through the identification of interacting surfaces monitored at residue level by NMR chemical shift perturbations, by titrating one ^{15}N -labelled protein with its unlabelled partner. While α -lactalbumin has a narrow interacting site, lysozyme has interacting sites scattered on a broad surface. The further assembly of these rather unspecific heterodimers into tetramers leads to the establishment of well defined interaction sites. Within the tetramers, most of the electrostatic charge patches on the protein surfaces are shielded. Then, hydrophobic interactions, which are possible because α -lactalbumin is in a partially folded state, become preponderant leading to the formation of larger oligomers. This approach will be particularly useful for rationalizing the design of protein assemblies as nanoscale devices.

Keywords:

Protein-protein interaction, self-assembly, transient heterodimers, preferential orientation, alpha-lactalbumin, lysozyme

Abbreviations:

hLAC: holo α -lactalbumin, aLAC: apo α -lactalbumin, LYS: lysozyme, NMR: Nuclear Magnetic Resonance, ^1H - ^{15}N HMQC: ^1H - ^{15}N Heteronuclear Multiple Quantum Coherence, Kd: Dissociation constant, $\Delta\delta$: combined chemical shift, $\Delta\delta_{\text{max}}$: combined chemical shift at saturation, CSP: Chemical Shift Perturbation.

INTRODUCTION

Interactions between proteins are ubiquitous in biological processes and their understanding remains one of the central purposes of biology, biochemistry and biophysics. Protein-protein interactions can lead to self-assembly within ordered aggregates. Nowadays, the use of protein self-assembly for the design of nanoscale devices receives an increasing interest.¹ Supramolecular objects resulting from protein assembly have been intensively characterized at macro-scale.²⁻⁵ Their morphology can be controlled by monitoring the physico-chemical conditions. Linear and fibrillar assembly, such as amyloid fibrils, are favoured at pHs far from the protein isoelectric point (pI) and at low ionic strength, when electrostatic repulsions are high. Contrarily, spherical objects are obtained by incubation of proteins at a pH close to their pI and at ionic strength favouring electrostatic interactions.⁶⁻⁸ The assembling properties of proteins are controlled by changing not only their physico-chemical properties but also their conformational state. Indeed, it is well-known that partial denaturation of proteins is a key parameter favouring protein assembly.⁹ In some cases, structural changes, such as intermolecular β -sheets formation in amyloid fibrils, are also involved; intermolecular β -sheets formation is likely to be responsible for protein assembly in a preferential direction leading to linear organisation. Although plenty of studies have been performed to characterize the resulting supramolecular objects at macro-scale, few studies are available to understand how information contained at molecular level spreads on macro-scale. In this study we propose to get insight into interactions at molecular scale driving the organisation of proteins into spherical supramolecular objects.

We focus on the interactions and self-assembly in a binary protein system involving bovine α -lactalbumin (LAC) and hen egg white lysozyme (LYS), two globular proteins of about 14 kDa and composed of 123 and 129 amino acids, respectively. They share a sequence identity of 35-40% and their three dimensional structures are similar, both composed of two domains separated by a cleft. Their α -domains contain four α -helices and the β -domains are composed of an antiparallel three-stranded β -sheet and a flexible loop. Their structures are stabilized by four disulfide bridges. Despite these similarities, LAC and LYS exhibit distinct biological function¹⁰: LAC is the regulatory subunit of the enzyme lactose synthase and LYS is a catalytic enzyme involved in the hydrolysis of Gram-positive bacterial cell wall peptidoglycans. These proteins differ also in their metal ion binding ability as well as their molecular stability. Egg white LYS belongs to the C-type family without specific metal

binding site, whereas LAC contains a calcium binding site located between the two domains. The binding constant is 10^{-7} - 10^{-8} M and binding of calcium stabilizes the tertiary structure of LAC.¹¹⁻¹² The denaturing temperature is 64°C for the calcium-loaded form, holo α -lactalbumin (hLAC), and 27°C for the calcium-depleted form, apo α -lactalbumin (aLAC).¹³ Above this melting point, aLAC adopts a molten globule state characterized by the presence of native secondary structure but no well-defined tertiary structure due to high side-chain flexibility.¹⁴⁻¹⁶ The stability of LYS is relatively high with no significant unfolding at acidic pH and its denaturing temperature is 74°C.¹⁷⁻¹⁸ A further important difference is that LAC is an acidic protein with a pI of 4.5, whereas LYS is a basic protein with a pI of 10.7. As a consequence, their charge is opposite at neutral pH. Their co-precipitation has been reported and electrostatic interactions have been evidenced.¹⁹⁻²⁰

Electrostatic interactions occur between LYS and both forms of LAC.²⁰⁻²³ With hLAC, only heterodimers are formed. By contrast, the interactions between LYS and aLAC lead to the formation of either amorphous aggregates or supramolecular ordered objects depending on protein concentration, pH, ionic strength and temperature. Densely packed microspheres of 1 to 5 μ m diameter in which both proteins are homogeneously distributed in an equimolar ratio, are formed at low ionic strength, pH 7.5 and 45°C.²⁴ The aLAC-LYS heterodimer has been proposed to constitute the building block for such self-assembly.

Although the assembly resulting from the interactions between aLAC and LYS has been investigated on a macroscale, no detail on protein-protein interface is available yet. The purpose of the present study is to determine the amino acids involved in the interactions at the early steps of the assembly mechanism leading to microspheres. The interface residues were determined according to the chemical shift perturbations monitored by nuclear magnetic resonance (NMR) during titration of one 15 N-labelled protein by its unlabelled partner. This approach has been widely adopted to establish the three-dimensional structure of biological complexes²⁵⁻²⁸ and to screen for high affinity protein ligands.²⁹⁻³¹ At the temperature favorable to microsphere formation (45°C), aLAC adopt a molten globule state which prevents the use of NMR to determine its interacting surface. In the case of the aLAC-LYS dimer, only the interacting region of LYS could be monitored. In order to get insight into the interacting region of LAC, the interfaces within hLAC-LYS have also been investigated although these dimers do not further assemble. Mapping of interacting residues on protein surfaces reveals that hLAC interacts with LYS through a narrow surface composed of amino acids located in the β -domain. The interacting surface of LYS is much more scattered with

amino acids belonging to both α - and β -domains. These findings correlate with predictions by molecular simulations and provide experimental evidence for an orientational effect due to electrostatic interactions. The interacting region of LYS with aLAC is similar to that obtained with hLAC. However, additional residues are involved in a cooperative manner. This evidences a second binding event. We interpret this effect as the further assembly of heterodimers into tetramers. Because most of the electrostatic charge patches are shielded within the tetramers, the hydrophobic interactions, which are possible because aLAC is in a partially folded state, become preponderant and lead to the formation of larger oligomers.

MATERIALS AND METHODS

Protein purification

Commercial lysozyme (LYS) was purchased from Ovonor. Holo α -lactalbumin (hLAC) was purified from bovine whey according to the method described by Caussin et al.³² Apo α -lactalbumin (aLAC) was obtained by removing the calcium by dialysis against water at pH 3.²⁴ Recombinant uniformly ^{15}N -labelled LYS and ^{15}N -labelled hLAC were produced and purified as previously reported.³³⁻³⁴

NMR experiments

All NMR spectra were obtained using a VARIAN vnmrs 800 spectrometer equipped with a triple-resonance (^1H , ^{13}C , ^{15}N) cold probe. Two-dimensional ^1H - ^{15}N heteronuclear multiple quantum coherence (HMQC) spectra were acquired using the band-Selective Optimized Flip-Angle Short-Transient (SOFAST) pulse sequence³⁵, using 128 scans and a recovery delay of 200 ms leading to an experiment duration of 54 min. For the ^1H and ^{15}N dimensions, 537 and 50 complex points and spectral widths of 13440 and 2400 Hz were used respectively. Zero filling were applied in both dimensions giving rise to 1536x200 points matrices. All spectra were processed using NMRPipe³⁶ and analyzed using NMRView³⁷.

Stock solutions of ^{15}N -labelled proteins (0.1 mM) and unlabelled proteins (2 mM) were prepared by solubilisation of protein powder in 30 mM Tris-HCl buffer containing 15 mM NaCl and 10% (v/v) D_2O , pH 7.5. They were filtered through a 0.2 μm membrane. The protein concentration was determined by measuring the absorbance at 280 nm using extinction coefficients of 2.64 $\text{L.g}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ for LYS and 2.01 $\text{L.g}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ for hLAC and aLAC.

The titrations experiments were carried out at 45°C. Once the ^1H - ^{15}N HMQC reference spectrum of the ^{15}N -labelled protein was recorded, the progress of the titration was monitored

by recording two-dimensional ^1H - ^{15}N HMQC spectrum after each addition of its unlabelled partner. The interaction surface of hLAC with LYS was determined by titrating 10 μM of ^{15}N -labelled hLAC with increasing amount of unlabelled LYS giving protein molar ratios LYS/ ^{15}N -hLAC of 1, 5, 10, 20, 30, 50, 75 and 100. The reverse titrations of ^{15}N -labelled LYS by unlabelled hLAC (titration points corresponding to hLAC / ^{15}N -LYS of 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 and 70) and ^{15}N -labelled LYS by unlabelled aLAC (aLAC / ^{15}N -LYS of 1, 5, 10, 20, 30, 40 and 50) were performed to determine the interaction surface of LYS with hLAC and aLAC, respectively. In order to assess non-specific chemical shift perturbations, the control titrations of ^{15}N -hLAC by unlabelled hLAC and ^{15}N -LYS by unlabelled LYS were performed in the same way for few titration points (unlabelled protein/ ^{15}N -labelled protein of 1, 15 and 30).

Data analysis

For each protein molar ratio, unlabelled protein/ ^{15}N -labelled protein, a combined chemical shift $\Delta\delta$ (ppm) was calculated per amino acid according to equation 1:³⁸

$$\Delta\delta(ppm) = \sqrt{(\Delta\delta^1H)^2 + \left(\frac{\gamma_N}{\gamma_H}(\Delta\delta^{15}N)\right)^2} \quad 1$$

where $\Delta\delta^1H$ and $\Delta\delta^{15}N$ are the variations of chemical shift compared to the reference spectrum in ^1H and ^{15}N dimensions, respectively and γ_N et γ_H are the magnetogyric ratio (rad/T.s) of ^1H and ^{15}N atoms respectively.

A simple equilibrium between two globular proteins in solution and a heterodimer was assumed for calculating the dissociation constant (Kd) and the combined chemical shift at saturation ($\Delta\delta_{\max}$) of logarithmic dependencies with equation 2.³⁹

$$\Delta\delta(ppm) = \left(\frac{\Delta\delta_{\max}}{2[P]_t}\right) \left([P]_t + [L]_t + Kd - \sqrt{([P]_t + [L]_t + Kd)^2 - 4[P]_t[L]_t}\right) \quad 2$$

where $[P]_t$ and $[L]_t$ are the total concentration of ^{15}N -labelled protein and unlabelled protein partner, respectively.

When the evolution of $\Delta\delta$ obeys to a sigmoid behavior, the Hill equation⁴⁰ (equation 3) was used for a first estimation of the apparent Kd and the $\Delta\delta_{\max}$

$$\Delta\delta(ppm) = \frac{\Delta\delta_{\max}[L]^n}{Kd^n + [L]^n} \quad 3$$

where n is the Hill coefficient.

When considering the association of two heterodimers into tetramer (Scheme 1), the logarithmic and sigmoid dependencies were fitted with equations 4 and 5, respectively:

$$\Delta\delta(ppm) = \frac{[PL] + 2[(PL)_2]}{[P]_t} \cdot \Delta\delta_{\max} \quad 4$$

$$\Delta\delta(ppm) = \frac{2[(PL)_2]}{[P]_t} \cdot \Delta\delta_{\max} \quad 5$$

where $[PL]$ and $[(PL)_2]$ are the concentrations of dimer and tetramer, respectively, expressed as function of the corresponding Kds (Kd_{DIMER} and Kd_{TETRAMER}):

$$[PL] = \frac{[P] \cdot [L]}{Kd_{\text{DIMER}}} \text{ and } [(PL)_2] = \frac{[PL]^2}{Kd_{\text{TETRAMER}}} = \frac{[P]^2 \cdot [L]^2}{Kd_{\text{DIMER}}^2 \cdot Kd_{\text{TETRAMER}}}$$

where $[P]$ and $[L]$ are the free concentrations of ^{15}N -protein and unlabelled protein partner at equilibrium, respectively. $[P]$ is expressed by equation 6, assuming that the amount of bound unlabelled protein is negligible as compared to its total concentration (i.e. $[L]_t = [L]$):

$$[P] = \left(\frac{Kd_{\text{DIMER}}^2 \cdot Kd_{\text{TETRAMER}}}{2[L]_t^2} \right) \left(- \left(1 + \frac{[L]_t}{Kd_{\text{DIMER}}} \right) + \sqrt{\left(1 + \frac{[L]_t}{Kd_{\text{DIMER}}} \right)^2 + 4[P]_t \cdot \frac{[L]_t^2}{Kd_{\text{DIMER}}^2 \cdot Kd_{\text{TETRAMER}}}} \right) \quad 6$$

Molecular simulation

Mesoscopic Monte Carlo simulations in the canonical ensemble were carried out using the Faunus software framework.⁴¹ The mutual spatial distribution function - directly related to the interaction free energy - were sampled for a pair of LYS and aLAC/hLAC model proteins at pH 7.5 and a salt concentration of 39 mM. Each protein is coarse grained to the amino acid level, based on experimentally determined crystal structures using the pdb entries 4LZT (LYS), 1F6S (hLAC) and 1F6R (aLAC). Proteins, counter-ions and salt particles are immersed in a spherical simulation cell containing a continuum solvent described by the dielectric constant of water, $\epsilon_r=80$.

RESULTS & DISCUSSION

CHEMICAL SHIFT PERTURBATION APPROACH. Interacting surfaces were identified according to chemical shift perturbations (CSPs) measured during the titration of one ^{15}N -labelled protein by its unlabelled partner. The use of band-Selective Optimized Flip-Angle Short-Transient (SOFAST) pulse sequence³⁵ enabled us to obtain well-resolved spectra in a reasonable time, even when working at 10 μM protein concentration in order to limit protein assembly. Only, the interaction surface of aLAC with LYS can not be determined using the CSP method. Indeed, the spectrum of ^{15}N -labelled aLAC shows a weak dispersion and broad resonances which are characteristic of the molten globule state at a temperature of 45°C (Figure S1).⁴² The reference ^1H - ^{15}N HMQC spectra of ^{15}N -labelled hLAC and ^{15}N -labelled LYS are well-resolved and show approximately 100 backbone amide cross-peaks which can be used to follow the titrations in detail (Figure 1). Changes in cross-peak chemical shifts reflect changes in the local environment of the ^{15}N -labelled protein backbone amides and therefore identify residues involved in the interaction with the unlabelled partner²⁹.

The approach can be illustrated with the titration of ^{15}N -labelled hLAC by unlabelled LYS. Figure 1a shows an overlay of the full spectra obtained after different additions of unlabelled LYS. The NMR spectra obtained during the titrations of ^{15}N -labelled LYS by both forms of LAC are depicted in supplemental material (Figure S2&S3). Examples of significantly changed resonances are depicted in Figure 1b. One can note that the crosspeak assigned to V42 is superimposed with another crosspeak within the reference spectrum and diverges upon titration. The observed chemical shift changes during titration can be attributed to the interactions between hLAC and LYS. Indeed, no significant shift is observed during the control titration, i.e. ^{15}N -labelled protein titrated by its unlabeled equivalent (Figure 1c), indicating that no homodimerization occurs. High concentrations of unlabelled protein are added at the end of the titration and, at that stage, cross peaks of this protein appears due to the natural abundance of ^{15}N (Figure 1a; blue lines). These additional cross peaks overlap sometime with those of the titrated ^{15}N -protein and induces ‘false positives’. The uncertain cross peaks are removed from the study (Table S1). The amino acids which are affected upon titration, are characterized by one single cross peak which is shifting together with an intensity decrease.

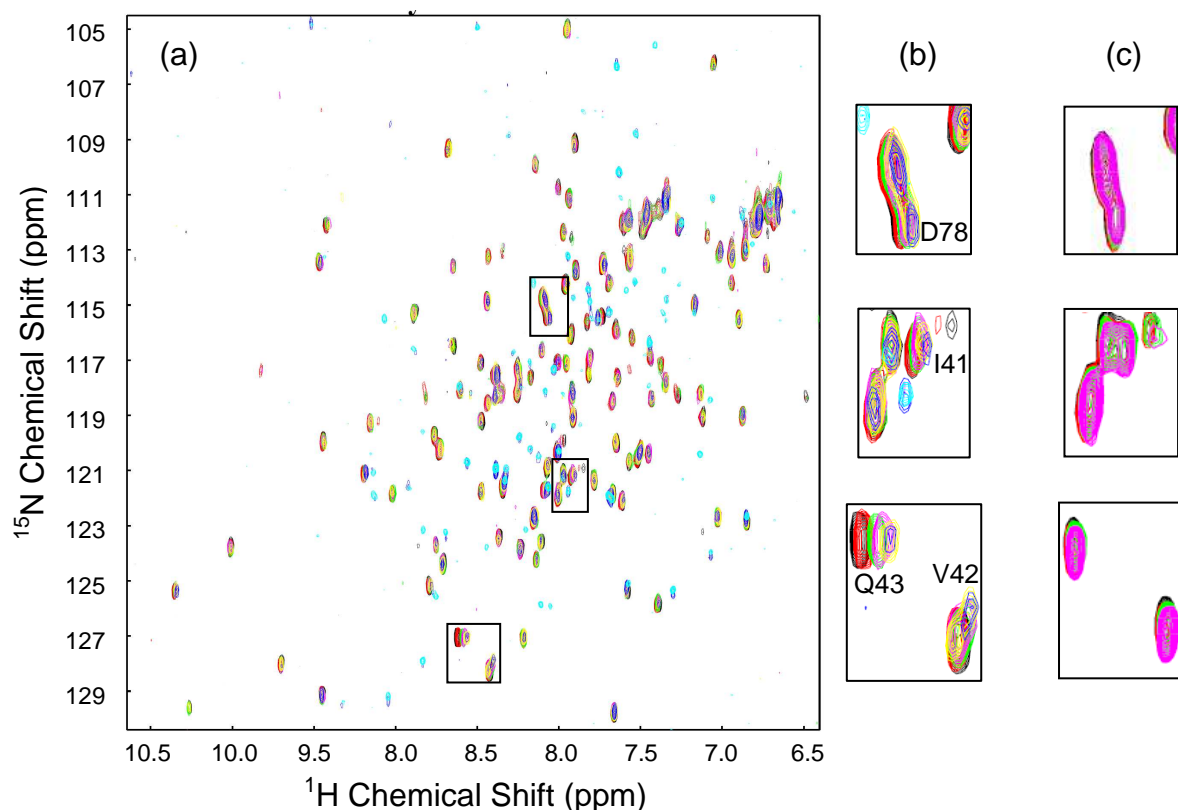


Figure 1: (a). Overlay of ^1H - ^{15}N HMQC spectra recorded during the titration of $10\ \mu\text{M}$ ^{15}N -hLAC by unlabelled LYS, in 30 mM Tris-HCl 15 mM NaCl at pH 7.5 and 45°C . The reference spectrum of ^{15}N -hLAC is coloured in black and the spectra obtained at protein ratio [unlabelled LYS]/[^{15}N -hLAC] equal to 5 in red, 20 in green, 30 in magenta, 50 in yellow and 100 in blue. The ^1H - ^{15}N HMQC spectrum of unlabelled LYS (light blue) was recorded through detection of ^{15}N natural abundance. (b). Highlights of spectral regions with shifting crosspeaks. (c). Highlights of similar spectral regions during the control titration. The reference spectrum of ^{15}N -hLAC is coloured in black and the spectra obtained at protein ratio [unlabelled hLAC]/[^{15}N -hLAC] equal to 1 in red, 15 in green, 30 in magenta.

There are two possible reasons for the intensity decrease because of signal broadening; either the exchange between dimer and monomers is on an intermediate time-scale for NMR⁴³ or the relaxation time changes due to increase of the apparent protein weight upon dimer formation⁴⁴. The total spectrum intensities, i.e. the sum of all peak intensities, normalized to that of the reference spectrum are reported as a function of the protein ratio in Figure 2. While only a linear decrease due the non-negligible dilution of ^{15}N -labelled proteins (from 10 to $8\ \mu\text{M}$) upon addition of its unlabelled partner is detected for the control experiments, a much larger decrease occurs during the heterodimer titration.

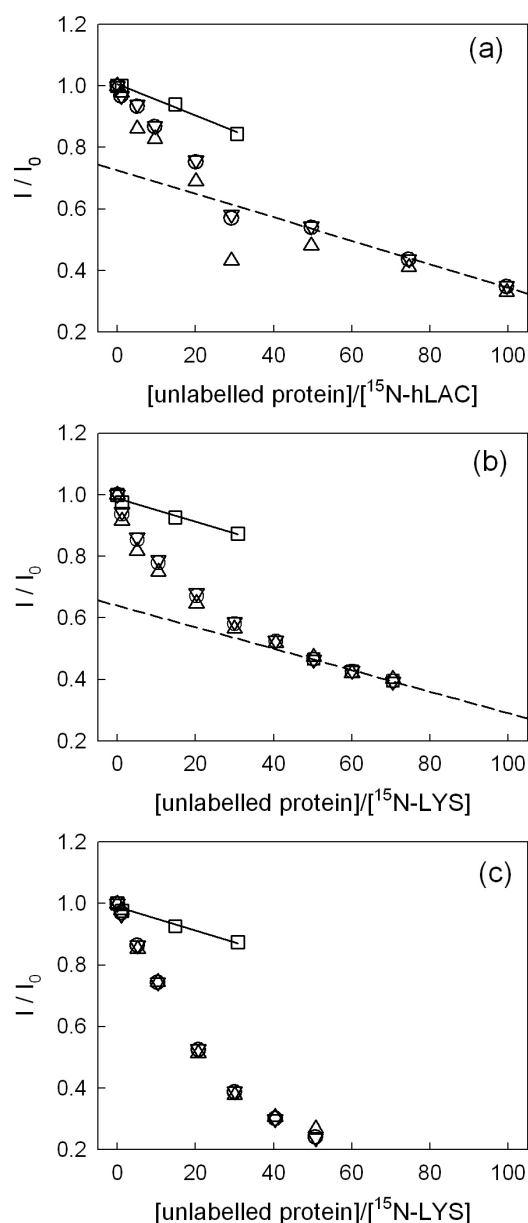


Figure 2: Total peak intensity changes during the titrations of ^{15}N -hLAC by LYS (a), ^{15}N -LYS by hLAC (b) and ^{15}N -LYS by aLAC (c). The total peak intensity (circle) was normalised to reference spectra and splitted into two groups: the total peak intensity of shifting (triangle up) and non affected (triangle down) peaks. The total peak intensity changes during the control titrations (square) of ^{15}N -hLAC by hLAC (a) and ^{15}N -LYS by LYS (b,c) are also depicted. Continuous lines correspond to linear regressions.

Considering the titrations involving hLAC and LYS (Figure 2a & b), half of the initial peak intensity is lost at protein ratio around 50. However, at higher protein ratio the dependence becomes linear with a slope similar to that of the control experiment. For the three types of titration, there is no difference in intensity decrease when considering shifting and non-affected cross-peaks independently; the peak intensity decrease is not specific to interacting residues but affects the whole protein. This differs from observations made during the early steps of amelogenin's supramolecular assembly.⁴⁵ In that case the dimer formation in on an intermediate time-scale for NMR, and the cross peak intensities decrease only for the

amino acids involved in the interactions. In our case, the signal broadening results from molecular weight increase of the formed complexes, rather than from the time-scale of the heterodimer formation. The dimer formation induces mostly a chemical shift change for the residues involved in the interaction, without additional signal broadening compared to that induced by the apparent weight increase. As a consequence, one can reasonably assume that the heterodimer formation is fast on NMR time scale, i.e. faster than the millisecond order of magnitude.⁴³

One can notice that the intensity decrease was found to be much more pronounced for the titration involving LYS and the apo form of LAC (Figure 2c). About 80% of the initial intensity was lost with a protein ratio of 20. Because of the substantial loss of NMR signal, the titration of ¹⁵N-LYS by aLAC was not performed for protein ratios higher than 50. This additional decrease of intensity reflects the appearance of larger oligomers upon the formation of dimers.

HOLOLAC-LYS DIMER. Only few cross-peaks are perturbed with increasing protein ratio LYS/¹⁵N-hLAC (Figure 1). The variations of their combined chemical shifts ($\Delta\delta$ calculated according to equation 1, see M&M) are shown in Figure 3a for selected examples. Despite rather small chemical shift changes (Figure 1b), which suggest weak interactions⁴⁶, clear tendencies are observed on the $\Delta\delta$ dependencies with the protein ratio. A plateau is reached for protein ratio larger than 100; this corresponds also to the boundary of the non-linear decrease of the peak intensities (Figure 2a), which is attributed to the heterodimer formation (see above). $\Delta\delta$ of significantly shifting amino acids (Table 1) were averaged and a dissociation constant ($K_{d\text{hLAC/LYS}}$) of $320 \pm 50 \mu\text{M}$ was determined by fitting the resulting titration curve with equation 2 (see M&M) (Figure 3b). This K_d obtained by the titration of $10 \mu\text{M}$ ¹⁵N-labelled protein is around 20 fold higher than the one previously determined in the same conditions by fluorescence anisotropy by titrating $1 \mu\text{M}$ protein.²² This apparent discrepancy is likely to be due to the fact that the fluorescence anisotropy method does not provide access to dissociation constants of magnitude orders larger the protein concentration giving rise to non-specific signal, i.e. $10 \mu\text{M}$. At higher protein concentration, artifacts occur that impair the fluorescence measurements.²² Furthermore, the hydrophobic fluorescent probe covalently bound to the proteins may increase protein affinity through non specific hydrophobic interactions. Overall, both features of the dimers, weak interaction and fast exchange, strongly suggest the transient character of the complexes.⁴⁷

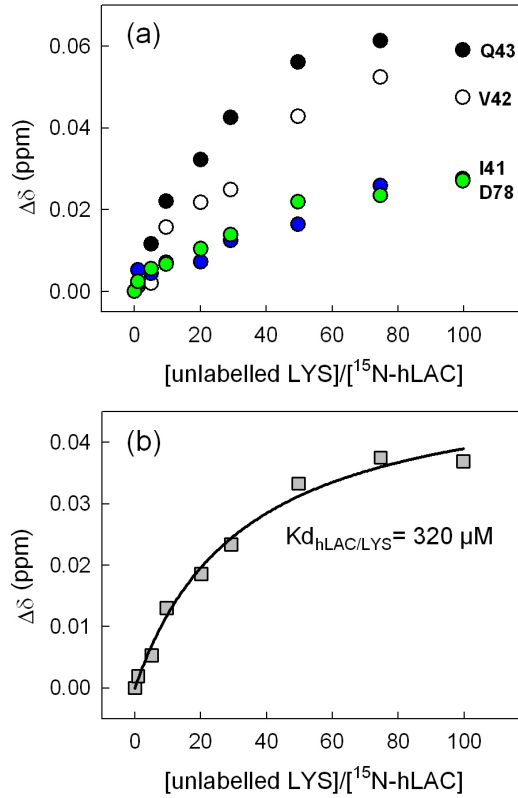


Figure 3: (a). Combined chemical shift ($\Delta\delta$) of ^{15}N -hLAC significant residues: Q43 (black), V42 (white), I41 (blue) and D78 (green), at various ratio of unlabelled LYS. (b). Averaged $\Delta\delta$ changes (grey squares): curve fitted with equation 2 (see text) (continuous line). The residues used for the averaging are listed in Table 1.

Dimer	Observed protein	Residues	Kd (μM)
hLAC-LYS	^{15}N -hLAC	T4, T38, V42, Q43, D78	$\text{Kd}_{\text{hLAC/LYS}} = 320 \pm 50$
	^{15}N -LYS	A32, S36, N77, A122	$\text{Kd}^1_{\text{LYS/hLAC}} = 293 \pm 52$
		G4, A9, I98, N103	$\text{Kd}^2_{\text{LYS/hLAC}} = 725 \pm 185$
aLAC-LYS	^{15}N -LYS	A9, F34, N37, N77	$\text{Kd}^{\text{L}}_{\text{LYS/aLAC}} = 390 \pm 90$
		E35, R125, C127, L129	$\text{Kd}^{\text{S}}_{\text{LYS/aLAC}} = 196 \pm 30$ Hill coefficient = 2

Table 1: Dissociation constants (Kd) and standard errors estimated by fitting the titration curves resulting from the averaged $\Delta\delta$ changes of listed residues with either logarithmic or sigmoid dependencies (see text). $\text{Kd}_{\text{hLAC/LYS}}$ and $\text{Kd}_{\text{LYS/hLAC}}$ were obtained by fitting the data obtained by titrating ^{15}N -hLAC by unlabelled LYS and ^{15}N -LYS by unlabelled LAC, respectively. In the latter, two distinct dependencies were observed (Kd^1 and Kd^2). $\text{Kd}^{\text{L}}_{\text{LYS/aLAC}}$ and $\text{Kd}^{\text{S}}_{\text{LYS/aLAC}}$ by fitting the titration curves obtained by titrating ^{15}N -LYS by unlabelled aLAC for either logarithmic (L) or sigmoid (S) dependencies.

It is noteworthy that, because of weak affinity, about 68% of ^{15}N -hLAC is bound to LYS at the end of the titration and, thus, $\Delta\delta$ of the fully bound state is not observed. Therefore, the combined chemical shift at saturation ($\Delta\delta_{\text{max}}$) of every residue was estimated by fitting their titration curves with equation 2 and $K_{\text{d,hLAC/LYS}}$ fixed at 320 μM . Figure 4a represents the pattern of $\Delta\delta_{\text{max}}$ changes as a function of the amino acid sequence of hLAC. Note that missing values correspond to non-assigned amino acids and false positives. The amino acids exhibiting a $\Delta\delta_{\text{max}}$ larger than a threshold value arbitrarily chosen for highlighting the most significantly changed amino acids (see legend of Figure 4a), are listed in Table S2. The same threshold will be used throughout this study. The amino acids of hLAC sensitive to the interaction with LYS are mainly located within in the N-terminal part of the β -sheet. A few others are found at the N-terminal part of the protein and within the long loop of the β -domain. As illustrated in Figure 4b on the crystal structure of hLAC, these residues are located on one side of the protein. One can notice here that, although most of the significantly shifted residues are solvent accessible (Table S2), some of them are not exposed at the protein surface. However, their environment must be influenced by local conformational changes because of their proximity with exposed amino acids involved in the interaction.⁴⁸

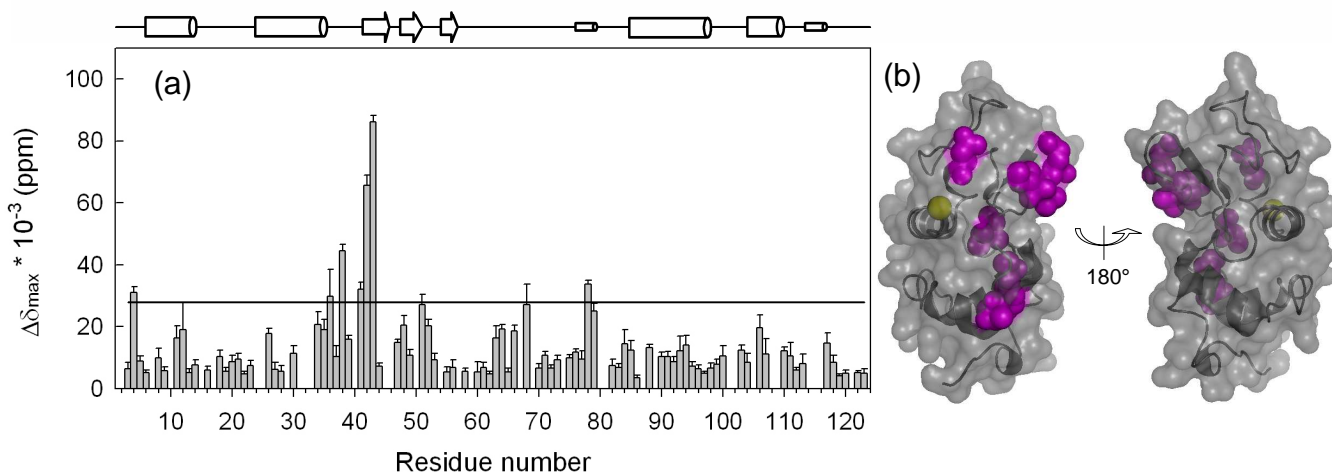


Figure 4: (a). Combined chemical shift changes at saturation ($\Delta\delta_{\text{max}}$) as a function of residue rank in the primary structure of hLAC. The $\Delta\delta_{\text{max}}$ values were estimated by fitting with equation 2 and $K_{\text{d,hLAC/LYS}}$ imposed at 320 μM , the $\Delta\delta$ changes monitored during the titration of ^{15}N -hLAC by unlabelled LYS for every considered residue. The error bars correspond to the standard error from the fit. The threshold value (horizontal line) corresponds to $\Delta\delta$ calculated with $\Delta\delta^1\text{H} = 0.02 \text{ ppm}$ and $\Delta\delta^{15}\text{N} = 0.2 \text{ ppm}$ and is equal to $28 * 10^{-3} \text{ ppm}$. The secondary structures regions of hLAC are depicted schematically above the panel. **(b). Localisation of residues in interaction with LYS in a ribbon representation of hLAC** (generated with Pymol). The residues with $\Delta\delta_{\text{max}}$ above the threshold are colored in purple, the calcium ion is depicted as a yellow hard sphere. The structures are represented after a 180° rotation around the vertical axis.

During the reverse titration, $\Delta\delta$ changes of significantly shifting residues with increasing ratio hLAC/ ^{15}N -LYS are shown in Figure 5a&b. In that case, two classes of interacting amino acids can be distinguished. Some residues, as illustrated with A32, S36 and N77 (Figure 5a), exhibit steeper titration curves as compared to others, such as A9, I98 and N103 (Figure 5b). Average dependencies have been calculated from each data set (Figure 5c and Table 1) and two dissociation constants ($Kd^1_{\text{LYS/hLAC}}$ and $Kd^2_{\text{LYS/hLAC}}$) have been determined. The dissociation constant corresponding to the steeper dependence: $Kd^1_{\text{LYS/hLAC}}$ ($293 \pm 52 \mu\text{M}$), is similar to $Kd_{\text{hLAC/LYS}}$, whereas $Kd^2_{\text{LYS/hLAC}}$ ($725 \pm 185 \mu\text{M}$) is larger. Figure 6a shows the pattern of $\Delta\delta_{\text{max}}$ changes as function of the amino acid sequence of LYS. The values of $\Delta\delta_{\text{max}}$ were estimated by fitting the chemical shift change of each amino acid with both values of Kd and the values provided by the best fit (i.e. giving the higher correlation coefficient) were reported: grey bars with $Kd^1_{\text{LYS/hLAC}}$ and black bars with $Kd^2_{\text{LYS/hLAC}}$. When compared to the pattern of hLAC (Figure 4a), the amino acids with significant chemical shift changes are scattered all along the sequence and the largest $\Delta\delta_{\text{max}}$ is about half. One can notice here that the extent of chemical shift change seems related to the broadness of the distribution of interaction sites. As illustrated in Figure 6b, the interacting residues of LYS (Table S2) are scattered on a larger surface than is the case for hLAC (Figure 4b). Notice, however, that the residues exhibiting a higher Kd value (colored in blue) are all located in the α -domain.

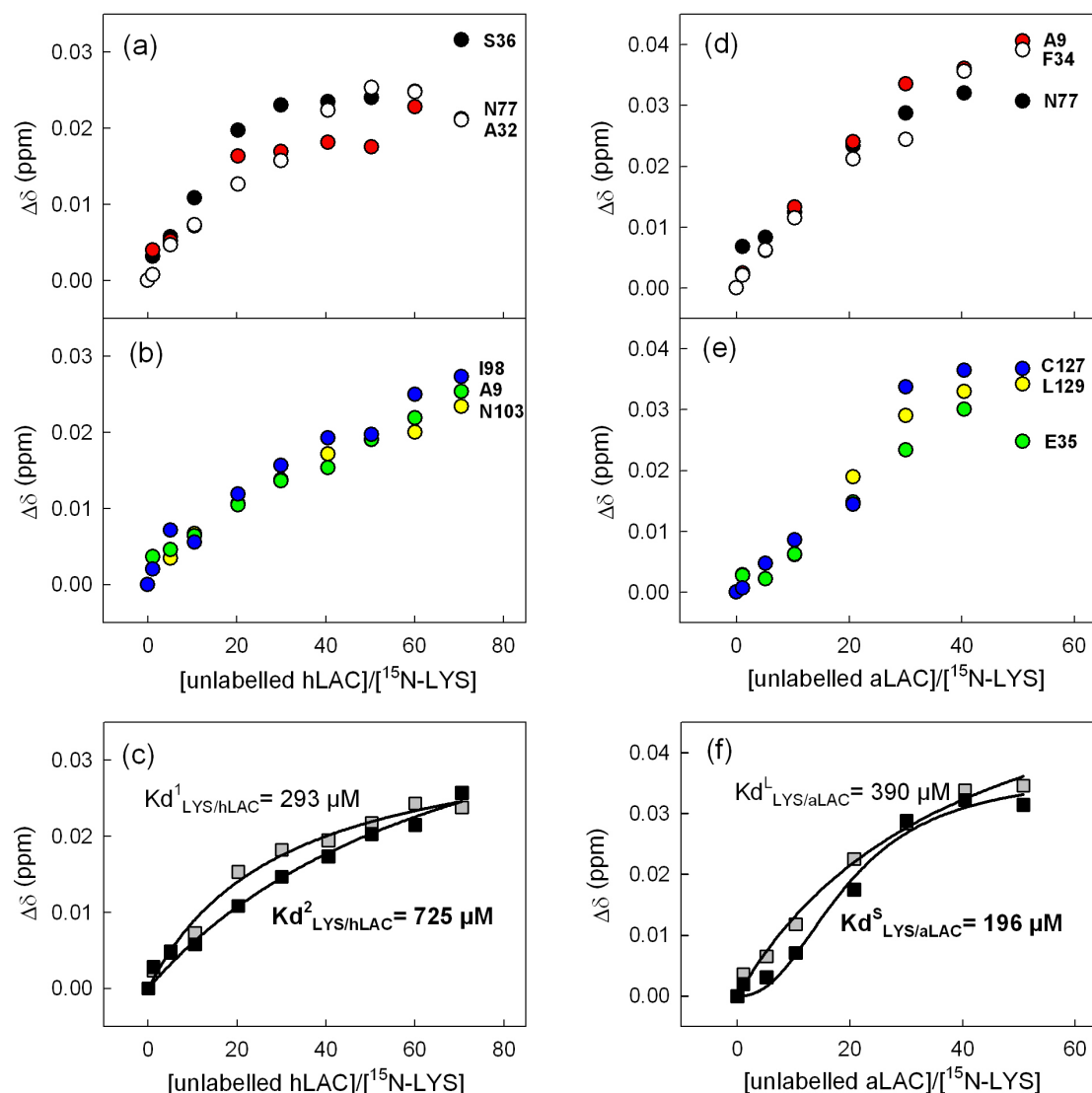


Figure 5: Combined chemical shift ($\Delta\delta$) changes of ^{15}N -LYS significant residues at various ratio of unlabelled hLAC (left panels) and unlabelled aLAC (right panels). (a). S36 (black), N77 (white) and A32 (red) and (b). I98 (blue), A9 (green) and N103 (yellow). (c). Averaged $\Delta\delta$ changes: curve fitted with equation 2 (see text) (continuous lines). (d). A9 (red), N77 (black) and F34 (white). (e). C127 (blue), L129 (yellow) and E35 (green). (f). Averaged $\Delta\delta$ changes of the residues with clear logarithmic behaviours (see Table 1) (grey squares), averaged $\Delta\delta$ changes of the residues with clear sigmoid behaviours (black squares). The continuous lines correspond to the results of the fitting with either a logarithmic or a sigmoid law (see text).

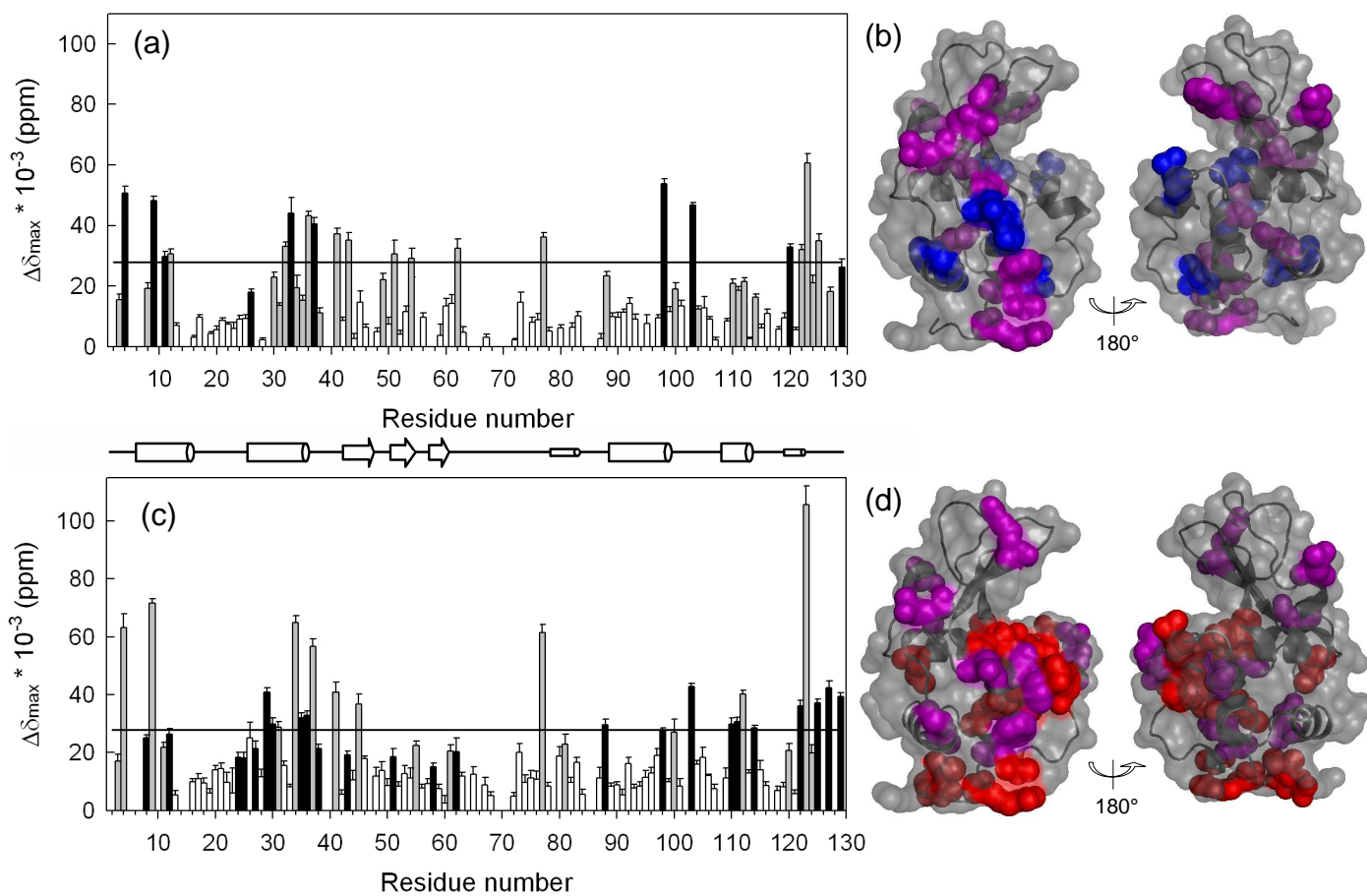


Figure 6: (a). Combined chemical shift changes at saturation ($\Delta\delta_{\max}$) as a function of residue rank in the primary structure of LYS, upon titration by hLAC. The $\Delta\delta_{\max}$ values were estimated by fitting the $\Delta\delta$ changes with equation 2 and Kd imposed to either 293 μM ($\text{Kd}^1_{\text{LYS/hLAC}}$) (grey bars) or 725 μM ($\text{Kd}^2_{\text{LYS/hLAC}}$) (black bars). When the data quality was not high enough to choose between the two possible Kds, the curve fitting was arbitrarily performed with $\text{Kd}^1_{\text{LYS/hLAC}}$ (white bars). **(b). Localisation of residues in interaction with hLAC in a ribbon representation of LYS.** The residues with $\Delta\delta_{\max}$ above the threshold (28×10^{-3} ppm) are colored either in purple or in blue when their changes obey to $\text{Kd}^1_{\text{LYS/hLAC}}$ or $\text{Kd}^2_{\text{LYS/hLAC}}$, respectively. The structures are represented after a 180° rotation around the vertical axis. **(c). Combined chemical shift changes at saturation ($\Delta\delta_{\max}$) as a function of residue rank in the primary structure of LYS, upon titration by aLAC.** The $\Delta\delta_{\max}$ values were estimated by fitting the $\Delta\delta$ changes with either a logarithmic law or a sigmoid law and Kd imposed to 390 μM ($\text{Kd}^L_{\text{LYS/aLAC}}$) (black bars) or 196 μM ($\text{Kd}^S_{\text{LYS/aLAC}}$ and $n = 2$) (grey bars). When the data quality was not high enough to choose between the two possible Kds, the curve fitting was arbitrarily performed with $\text{Kd}^L_{\text{LYS/aLAC}}$ (white bars). **(d). Localisation of residues in interaction with aLAC in a ribbon representation of LYS.** The residues with $\Delta\delta_{\max}$ above the threshold are colored either in purple or in red when their changes obey to a logarithmic or a sigmoid law, respectively.

According to previous studies, electrostatic interactions are preponderant for the heterodimer formation.^{20, 23} Positively charged patches on the LYS surface are expected to interact with negatively charged patches on the LAC surface. LYS possesses mostly positive charges which are rather homogenously distributed on its surface (Figure 7a). The surface electric charge distribution of LAC is uneven (Figure 7b), with a face containing negative charges only and another one with a mix of negative and positive charges. This gives LAC a strong dipolar moment (400 Debye), whereas the dipole moment of LYS is 2-3 times weaker (140 Debye).²³

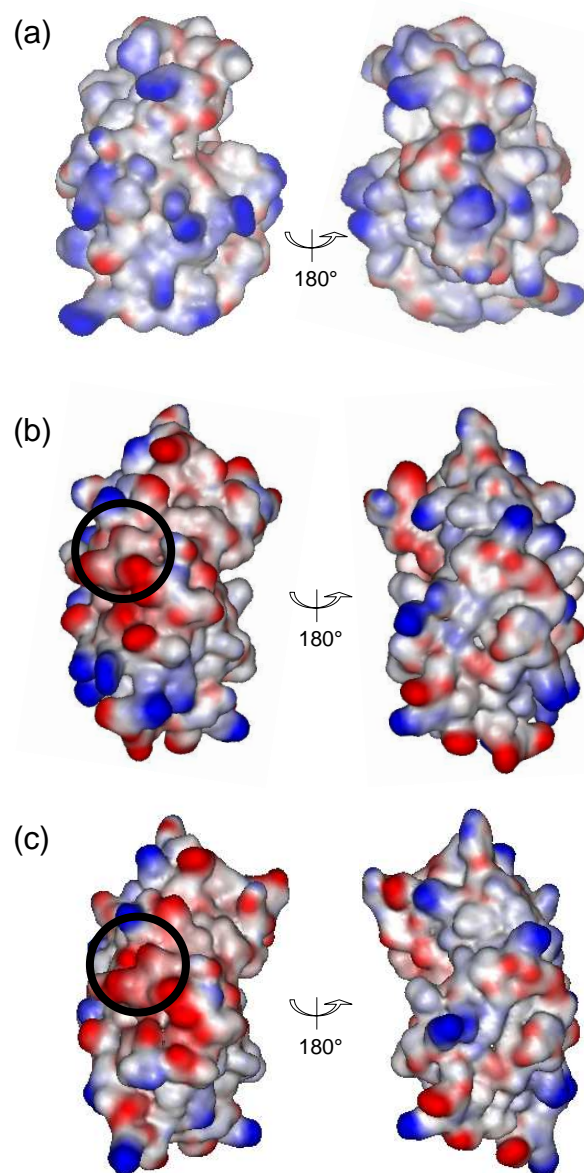


Figure 7: Electrostatic surfaces of LYS (a), hLAC (b) and aLAC (c). The electrostatic potential was calculated with Delphi at 39 mM ionic strength and pH 7.5. Negative and positive surface patches are represented in red and blue, respectively. Proteins are represented in the same orientation as in figures 4 and 6 and after rotation of 180° around the vertical axis. The calcium binding site of LAC is surrounded by the black circle. The pictures were generated with Accelrys.

The probability to find one protein around the other was estimated by Monte Carlo simulations at pH 7.5 and a salt concentration of 39 mM, with the same approach as previously used for investigating the electrostatic interactions between LAC and LYS at lower ionic strength.²³ The two proteins and salt particles are placed within a simulation cell containing a continuum solvent described by the dielectric constant of water ($\epsilon = 80$). The model explicitly incorporates van der Waals interactions as well as continuum electrostatic interactions between ionized residues while allowing for a continuum exploration of Boltzmann averaged inter-protein orientations. The isodensity surfaces represent the spatial distribution, i.e. all the possible locations, of protein residues when interacting with its partner during the trajectories drawn from Monte Carlo simulations (Figure 8). The green isodensity surface around hLAC shows that LYS is steered towards the negative pole of the dipolar moment of hLAC (Figure 8a). This area matches very well with the interacting surface of hLAC determined experimentally (Figure 8a, purple side-chains). The distribution of hLAC residues around LYS (orange isodensity surface) is more scattered with a preference for the equator of the egg-shape LYS (Figure 8b). This distribution correlates very well with the more diffuse interacting surface of LYS with hLAC determined by NMR (Figure 8b, purple and blue side-chains). These results evidence that the extent of preferential orientation of protein is related to the dipolar moment strength and that heterodimers exhibit a relatively low specificity of binding. The residues on LYS surface exhibiting a higher K_d value are probably involved in the less specific contacts amongst all the possible configurations of the heterodimers.

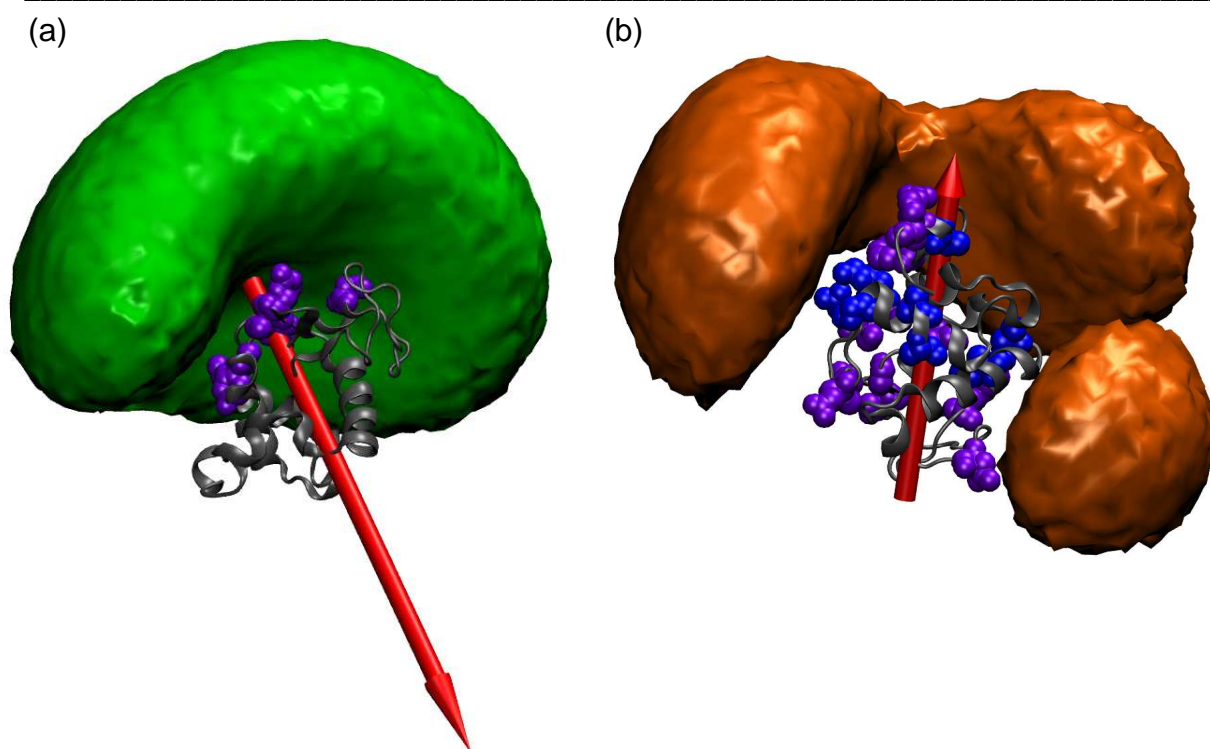
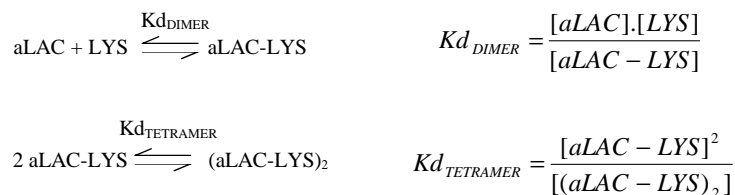


Figure 8: Combination of computational and experimental results. (a) LYS distribution around hLAC. The green surface is the LYS isodensity surface around hLAC. Interacting residues of hLAC determined experimentally are represented as purple hard spheres. **(b). hLAC distribution around LYS.** The orange surface is the hLAC isodensity surface around LYS. Interacting residues of LYS determined experimentally are represented as hard spheres colored either in purple ($Kd^1_{\text{LYS/hLAC}}$) or blue ($Kd^2_{\text{LYS/hLAC}}$). The red arrow represents the electric dipole moment equal to 400 and 140 Debye for holoLAC and LYS, respectively. Graphics produced using VMD.

APOLAC-LYS DIMER. The interactions between LYS and the apo form of LAC lead to the formation of heterodimers and then to larger oligomers. This further oligomerization results in the formation of supramolecular structures.^{22, 24} Under the conditions propitious to microspheres formation (45°C), aLAC is in a partially folded state, the so-called molten globule state. As a consequence, it is not possible to monitor its interacting surface. Nevertheless, the spectra obtained during the titration performed for few unlabelled LYS/¹⁵N-aLAC ratios do not become more resolved (Figure S1). Therefore, aLAC remains in its molten globule state and its interaction with LYS does not lead to stabilization of its tertiary structure.

During the titration of ^{15}N -LYS by aLAC, two different types of $\Delta\delta$ dependencies with protein ratio are observed: a classical logarithmic one (Figure 5d) and a sigmoid dependence with a lag-phase at low protein ratio (Figure 5e). The sigmoid dependencies denote a cooperative binding. These residues are involved in the interaction with aLAC in a sequential manner; they are not involved in the first binding event but in a second one. As a first approach no assumption is made about the reaction scheme of the events monitored during this titration; averages of each data set (Figure 5f) were fitted with either equation 2, which corresponds to a simple binding, or the Hill equation (equation 3 in M&M) for the sigmoid dependencies, and two dissociation constants ($K_d^{\text{L}}_{\text{LYS/aLAC}}$ and $K_d^{\text{S}}_{\text{LYS/aLAC}}$) were calculated (Table 1). The value of $K_d^{\text{L}}_{\text{LYS/aLAC}}$ ($390 \pm 90 \mu\text{M}$) is identical within the error limit to that obtained for the hLAC-LYS dimer ($K_{\text{d}}^{\text{hLAC/LYS}}$ and $K_d^{\text{L}}_{\text{LYS/hLAC}}$). For the sigmoid dependencies, $K_d^{\text{S}}_{\text{LYS/aLAC}}$ is lower with a value equal to $196 \pm 30 \mu\text{M}$ and a Hill coefficient around 2. The pattern of $\Delta\delta_{\text{max}}$ is shown in Figure 6c: grey and black bars when best fitted with $K_d^{\text{L}}_{\text{LYS/aLAC}}$ and $K_d^{\text{S}}_{\text{LYS/aLAC}}$, respectively. This pattern shows some similarities with that obtained in the presence of hLAC (Figure 6a). However, larger chemical shift changes are observed and the majority of the residues with $\Delta\delta_{\text{max}}$ larger than the defined threshold belong to the α -domain (Figure 6c and Table S2). All the residues with a sigmoid behavior are localized within the α -domain (Figure 6d, colored in red) and they define a region around an interaction site defined by residue with logarithmic behavior (Figure 6d, colored in purple). One can notice that the $\Delta\delta_{\text{max}}$ estimated with the sigmoid equation (Figure 6c; black bars) are on average half those obtained with the logarithmic equation (Figure 6c; grey bars).

The cooperative dependencies of several residues imply that at least two events of the interactions between aLAC and LYS are monitored, these residues being sensitive to the second event only. A straightforward possibility is that the heterodimers further assemble into tetramers. This can be described by the sequential reaction (Scheme 1). The residues involved in the interaction as the first binding event begins, i.e. dimer formation, show a logarithmic-like behavior (Figure 5d&f) and those only involved in the second event, i.e. the further assembly of dimer into tetramer, have a sigmoid behavior (Figure 5e&f). By considering these two equilibriums, the averaged titration curves (Figure 5f) are well fitted with the equations 4 and 5 (M&M) (Figure 9).



Scheme 1: Reaction scheme of dimer and tetramer formation with the expression of the corresponding dissociation constants ($K_{\text{d}_{\text{DIMER}}}$ and $K_{\text{d}_{\text{TETRAMER}}}$).

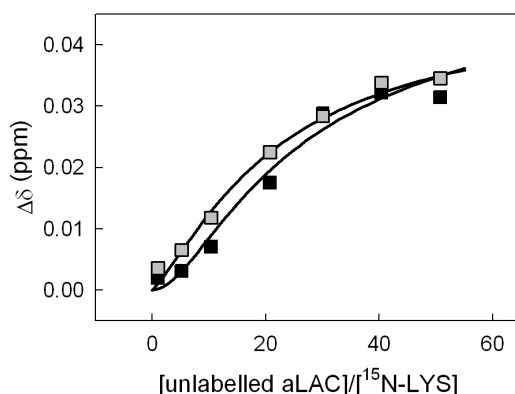
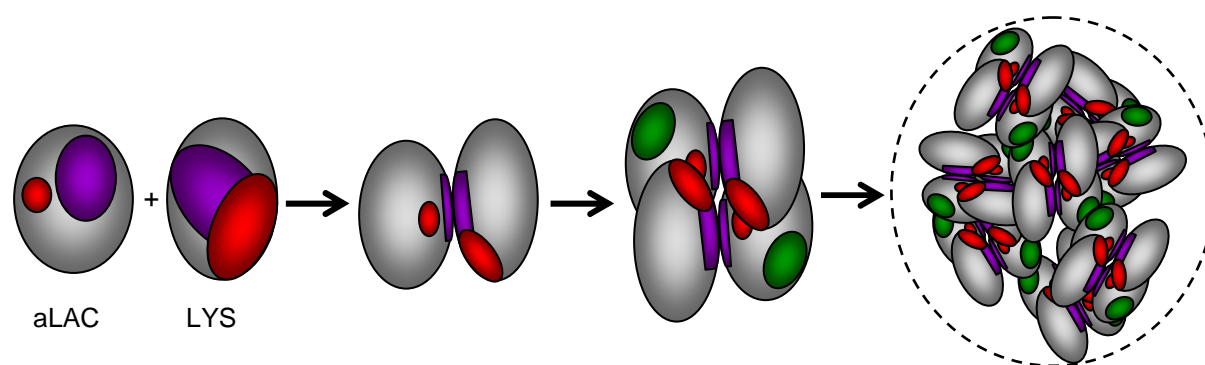


Figure 9: Evolutions of $\Delta\delta$ obtained during the titration of ^{15}N -LYS by aLAC fitted by assuming a sequential reaction described in Scheme 1. The dissociation constants of dimer ($K_{\text{d}_{\text{DIMER}}}$) and tetramer ($K_{\text{d}_{\text{TETRAMER}}}$) were evaluated by fitting the logarithmic (grey squares) and sigmoid (black squares) dependencies with equation 4 and 5, respectively, giving $K_{\text{d}_{\text{DIMER}}} = 450 \pm 70 \mu\text{M}$, $\Delta\delta_{\text{maxDIMER}} = 0.05 \pm 0.005 \text{ ppm}$ and $K_{\text{d}_{\text{TETRAMER}}} = 5.0 \pm 2.5 \mu\text{M}$, $\Delta\delta_{\text{maxTETRAMER}} = 0.08 \pm 0.002 \text{ ppm}$. The continuous lines correspond to the best fits.

From these results, the dimer dissociation constant ($K_{\text{d}_{\text{DIMER}}}$) is estimated to $490 \pm 70 \mu\text{M}$ and the one for tetramer formation ($K_{\text{d}_{\text{TETRAMER}}}$) to $5.0 \pm 2.5 \mu\text{M}$. Despite the quite high uncertainty on the fit parameter values, it is possible to reproduce the general features of the dependencies. The behavior of residues with logarithmic dependencies (Figure 9; grey squares) can be fitted to the evolution of the amount of LYS involved in oligomers (without distinction between dimer and tetramer). The general features of this dependency are sensitive mainly to $K_{\text{d}_{\text{DIMER}}}$ and weakly to $K_{\text{d}_{\text{TETRAMER}}}$ and, as a consequence, $K_{\text{d}_{\text{DIMER}}}$ is close to $K_{\text{d}_{\text{LYS/aLAC}}}^{\text{L}}$ (Figure 5f). The value of $K_{\text{d}_{\text{TETRAMER}}}$ is about two orders of magnitude lower than that of $K_{\text{d}_{\text{DIMER}}}$. This is not surprising because the equilibrium between dimer and tetramer is controlled by the maximal dimer concentration which is limited by the LYS concentration (i.e. $10 \mu\text{M}$ in our experiments). Therefore the dissociation constant must be at

maximum of the same order of magnitude as the LYS concentration in order to have significant tetramer formation. Therefore, our titration data can be interpreted on the basis of the further association of heterodimers into tetramers (Scheme 1). Moreover, the appearance of tetramers is drastically favoured once the aLAC-LYS dimers are formed. One can notice here that, according to the value of $K_{d\text{TETRAMER}}$, only 50% of the LYS can be involved in tetramer. Going back to our measurements, this implies that the chemical shift variation of residues with sigmoid behavior is, at the end of the titration, only about half of what it should be if LYS was fully involved in tetramer. This can explain the difference of $\Delta\delta_{\text{max}}$ between residues with logarithmic behavior and those with sigmoid behavior (Figure 6c).

Based on our observations we can propose a mechanism for the tetramer formation and their assembly into supramolecular objects (Scheme 2). Although we do not have experimental data on aLAC interacting surface, the topology of the protein in its molten globule state remains native-like, with a significant amount of native contacts between side-chains.⁴⁹ Therefore it is reasonable to assume that aLAC is interacting with LYS to form dimer through a similar region to that evidenced on hLAC surface. This hypothesis is also supported by the fact that the interacting surfaces of LYS with both forms of LAC are located in the same region of LYS. The tetramer formation requires further interactions between aLAC and LYS and involves additional LYS residues, i.e. those with sigmoid dependencies. The absence of bound calcium on aLAC induces the presence of another negatively charged patch on the surface (Figure 7c), which may constitute a second site for interacting with LYS. Indeed, LYS remains in a compact state; i.e. without hydrophobic patch on its surface, and it is reasonable to assume that these additional interactions required for tetramer formation are still predominantly electrostatic. These secondary interactions between aLAC and LYS lead to narrow the ensemble of possible heterodimer conformations among the numerous possibilities illustrated in Figure 8 and results in a tighter binding. Furthermore, aLAC is in a molten globule state, i.e. with hydrophobic patches on the surface because of destabilized tertiary structure. Upon tetramer formation, most of the charges on the protein surfaces are shielded, and the interactions through the hydrophobic patches present on aLAC surface become preponderant facilitating the further aLAC-LYS self-assembly into larger oligomers. However, the factors which control the formation of microspheres instead of amorphous aggregates are still unknown.



Scheme 2: Schematic representation of aLAC-LYS dimer and tetramer formation. The LYS interacting surface determined experimentally is represented in purple ($Kd_{LYS/aLAC}^L$) and the residues interacting in a cooperative manner ($Kd_{LYS/aLAC}^S$) are represented in red. Residues of aLAC involved in dimer formation are supposed to be located in a similar region of that determined experimentally for hLAC (purple) and additional binding residues correspond to those near the calcium binding site (red). The aLAC is slightly larger than LYS since the molten globule state of LAC is known to be less compact than the native state^{50, 46}. A first binding event involves purple patches whereas the second binding event for tetramer formation involves red patches. Oligomerisation into supramolecular objects is mainly driven by hydrophobic associations favoured by the exposition of hydrophobic patches (green) on the surface of molten globule of aLAC.

CONCLUSION

In summary, the work described here provides insights into the assembly mechanisms of ordered aggregates by two proteins. The initial formation of heterodimers is driven by electrostatic interactions. Despite the rather unspecific and weak interactions between the two proteins, the NMR approach leads to the identification of the interaction surfaces. One of the proteins has a narrow interacting site while the second has interacting sites scattered on a broad surface. These findings agree with a preferential alignment between proteins resulting from the strength of their dipole moments. The further assembly of these rather unspecific heterodimers into tetramers leads to the tighter interactions between both proteins. Within the tetramers, most of the electrostatic charge patches on the protein surfaces are shielded. As consequence, the hydrophobic interactions, which are possible because one of the proteins is in a partially folded state, become preponderant and lead to the formation of larger oligomers. We are convinced that such approach will be particularly useful to understand the formation of ordered aggregates by proteins. It should be extended to other mixed protein systems in order to unravel their self-assembly mechanisms and rationalize their use in the design of nanoscale devices.

Acknowledgements

We are very grateful to C. Bougault for fruitful discussions. We thank the French NMR platform at IBS (Grenoble, France) for the access to the 800 MHz NMR Spectrometer (TGE RMN THC Fr3050). This work was supported in part by the French National Research Agency (Grant ANR PNRA LACLYS), the INRA (Rennes, France) and the CEA (Grenoble, France). BP and ML thank the Swedish Linneaus Center of Excellence “Organizing Molecular Matter” for financial support. RS is supported by the Polytechnische Stiftung, HS is member of the DFG-funded cluster of excellence: macromolecular complexes. BMRZ is funded by the state of Hesse.

Supporting information available: Detailed Materials&Methods and supporting Figures S1, S2 & S3 and Tables S1 & S2. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

SUPPORTING INFORMATION

Observed protein	Unlabelled partner	False positives
¹⁵ N-hLAC	LYS	Q2, E7, R10, G17, F31, H32, T33, A40, F80, D87
¹⁵ N-LYS	hLAC	D18, N27, V29, I55, Q57, I58, N65, R68, N74, S81, L84, C94, K96

Table S1: ¹⁵N-protein residues defined as false positives because of their overlap with resonances of the unlabelled partner. These resonances appear at high unlabelled protein concentration (above 400 μM; ration between unlabelled and labelled proteins above 50) through detection of ¹⁵N natural abundance.

Observed protein	Partner protein	Significantly shifting residues	Secondary structure elements	Solvent accessibility
hLAC	LYS	T4	α A	+
		Y36	l	-
		T38	l	-
		I41	β 1	+
		V42	β 1	+
		Q43	β 1	+
		D78	3_{10}	+
LYS	hLAC	G4*	l	+
		A9*	α A	-
		A11*	α A	-
		M12	α A	-
		A32	α B	-
		K33*	α B	+
		S36	l	+
		N37*	l	+
		Q41	l	+
		T43	β 1	+
		T51	β 2	-
		G54	β 2	-
		W62	l	+
		N77	l	+
		I98*	α C	-
		N103*	l	+
		V120*	3_{10}	-
		A122	3_{10}	+
		W123	3_{10}	+
		R125	l	+
LYS	aLAC	G4	l	+
		A9	α A	-
		V29°	α B	-
		C30°	α B	-
		A31	α B	-
		F34	α B	+
		E35°	α B	+
		S36°	l	+
		N37	l	+
		Q41	l	+
		R45	β 1	+
		N77	l	+
		I88°	l	-
		I98°	α C	-
		N103°	l	+
		A110°	α D	+
		W111°	α D	-
		R112	α D	+
		R114°	α D	+
		A122°	3_{10}	+
		W123	3_{10}	+
		R125°	l	+
		C127°	l	+
		L129°	l	+

Table S2: Residues with $\Delta\delta_{\max}$ above the threshold (28×10^{-3} ppm). (*) residues with $Kd^2_{\text{LYS/hLAC}}$ ($725 \mu\text{M}$); (°) residues with $Kd^s_{\text{LYS/aLAC}}$ ($196 \mu\text{M}$) and a Hill coefficient equal to 2. The amino acid localisation in secondary structure elements is encoded by α : α -helix, 3_{10} : 3_{10} helix, β : β -strand, l: loop, and their solvent accessibility, calculated with Accelrys, is rated as + or -.

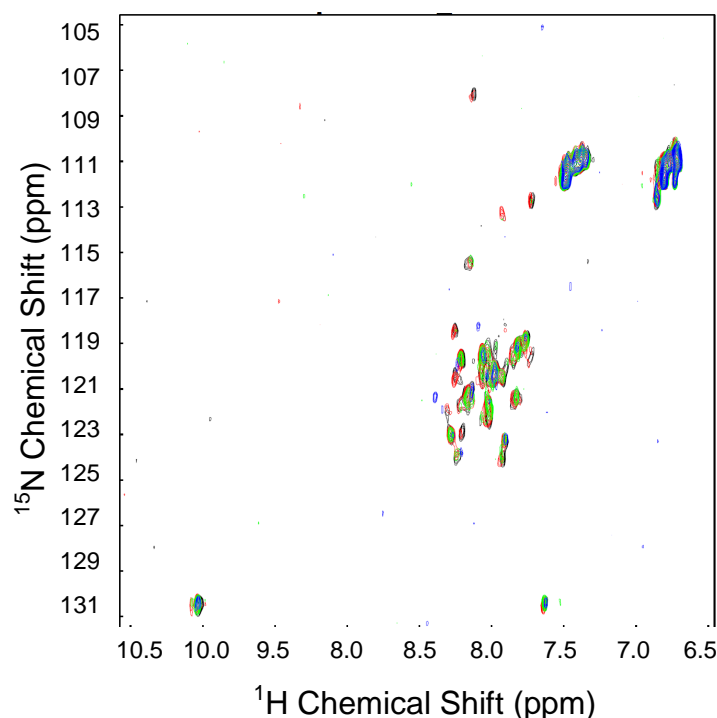


Figure S1: Overlay of ^1H - ^{15}N HMQC spectra recorded during the titration of $10\ \mu\text{M}$ ^{15}N -aLAC by unlabelled LYS, in 30 mM Tris-HCl 15 mM NaCl at pH 7.5 and 45°C . The reference spectrum of ^{15}N -aLAC is coloured in black and the spectra obtained at protein ratio [unlabelled LYS]/[^{15}N -aLAC] equal to 5 in red, 10 in green, 30 in blue.

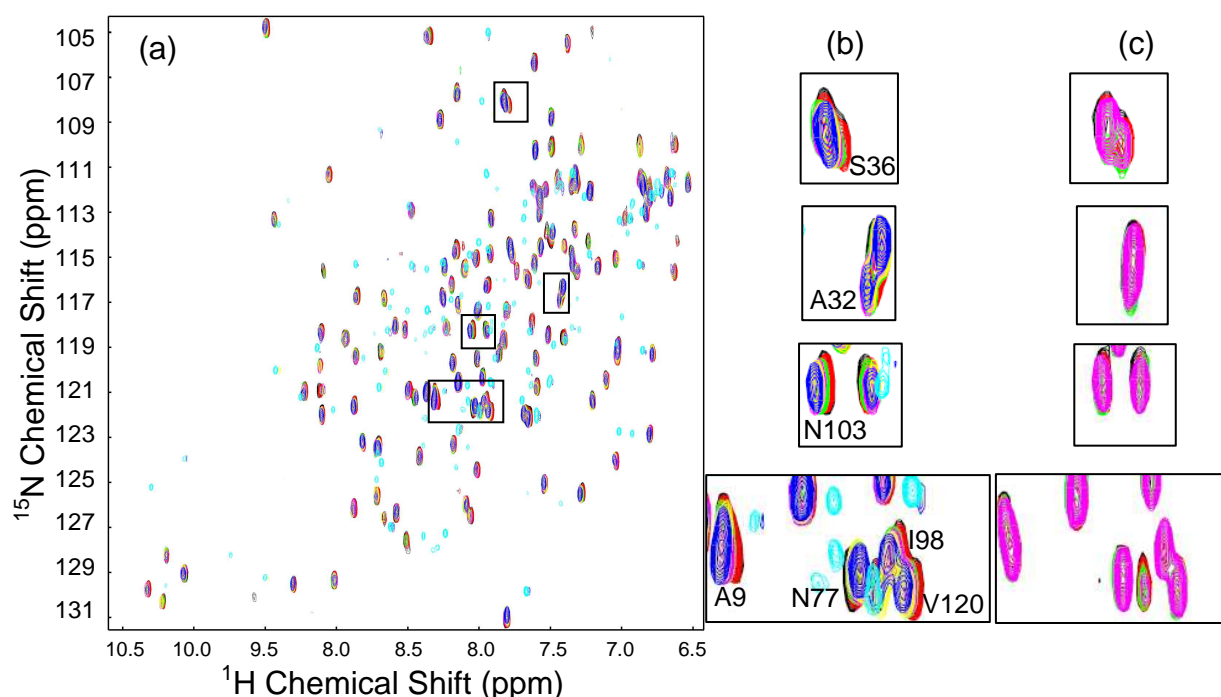


Figure S2: (a). Overlay of ^1H - ^{15}N HMQC spectra recorded during the titration of $10\ \mu\text{M}$ ^{15}N -LYS by unlabelled hLAC, in 30 mM Tris-HCl 15 mM NaCl at pH 7.5 and 45°C . The reference spectrum of ^{15}N -LYS is coloured in black and the spectra obtained at protein ratio [unlabelled hLAC]/[^{15}N -LYS] equal to 5 in red, 10 in green, 30 in magenta, 50 in yellow and 70 in blue. The ^1H - ^{15}N HMQC spectrum of unlabelled hLAC (light blue) was recorded through detection of ^{15}N natural abundance. (b). Highlights of spectral regions with shifting cross-peaks. (c). Highlights of similar spectral regions during the control titration. The reference spectrum of ^{15}N -LYS is coloured in black and the spectra obtained at protein ratio [unlabelled LYS]/[^{15}N -LYS] equal to 1 in red, 15 in green, 30 in magenta.

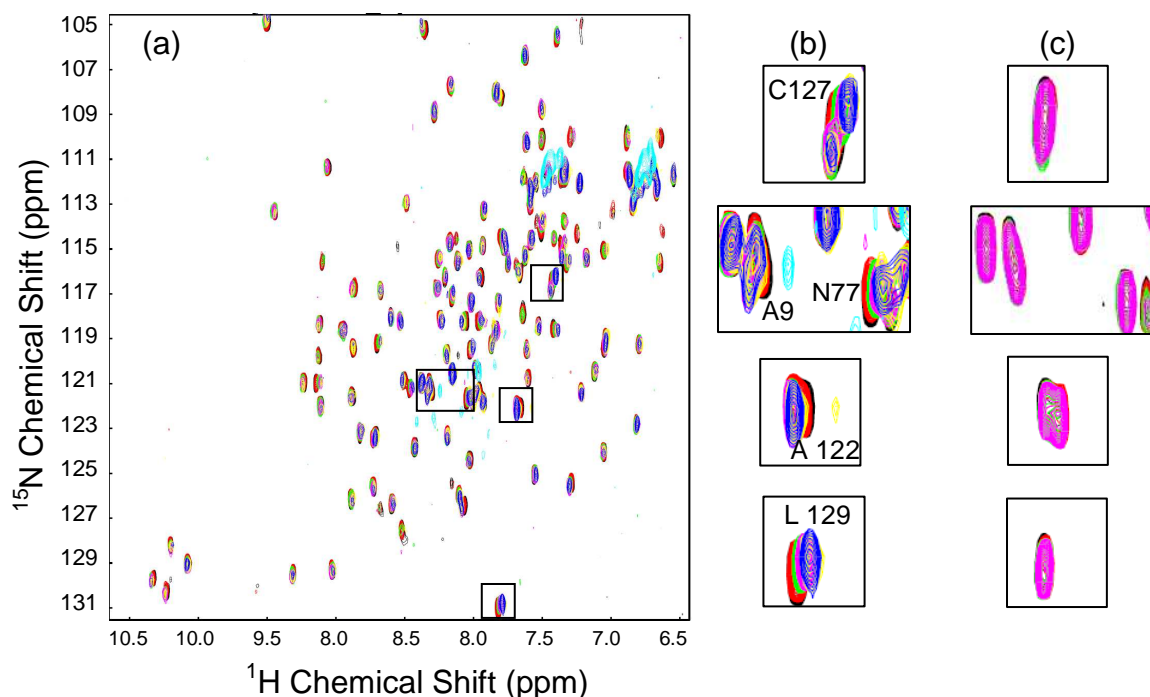


Figure S3: (a). Overlay of ^1H - ^{15}N HMQC spectra recorded during the titration of $10\ \mu\text{M}$ ^{15}N -LYS by unlabelled aLAC, in 30 mM Tris-HCl 15 mM NaCl at pH 7.5 and 45°C . The reference spectrum of ^{15}N -LYS is coloured in black and the spectra obtained at protein ratio [unlabelled aLAC]/[^{15}N -LYS] equal to 5 in red, 20 in green, 30 in magenta, 40 in yellow and 50 in blue. The ^1H - ^{15}N HMQC spectrum of unlabelled aLAC (light blue) was recorded through detection of ^{15}N natural abundance. **(b).** Highlights of spectral regions with shifting cross-peaks. **(c).** Highlights of similar spectral regions during the control titration. The reference spectrum of ^{15}N -LYS is coloured in black and the spectra obtained at protein ratio [unlabelled LYS]/[^{15}N -LYS] equal to 1 in red, 15 in green, 30 in magenta.

References

1. Zhang, S. G., Fabrication of novel biomaterials through molecular self-assembly. *Nature Biotechnology* **2003**, 21, (10), 1171-1178.
2. van der Linden, E.; Venema, P., Self-assembly and aggregation of proteins. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **2007**, 12, (4-5), 158-165.
3. Goers, J.; Permyakov, S. E.; Permyakov, E. A.; Uversky, V. N.; Fink, A. L., Conformational prerequisites for alpha-lactalbumin fibrillation. *Biochemistry* **2002**, 41, (41), 12546-12551.
4. Krebs, M. R. H.; Wilkins, D. K.; Chung, E. W.; Pitkeathly, M. C.; Chamberlain, A. K.; Zurdo, J.; Robinson, C. V.; Dobson, C. M., Formation and seeding of amyloid fibrils from wild-type hen lysozyme and a peptide fragment from the [beta]-domain. *Journal of Molecular Biology* **2000**, 300, (3), 541-549.
5. Sagis, L. M. C.; Veerman, C.; van der Linden, E., Mesoscopic properties of semiflexible amyloid fibrils. *Langmuir* **2004**, 20, (3), 924-927.
6. Desfougeres, Y.; Croguennec, T.; Lechevalier, V.; Bouhallab, S.; Nau, F., Charge and Size Drive Spontaneous Self-Assembly of Oppositely Charged Globular Proteins into Microspheres. *Journal of Physical Chemistry B* **2010**, 114, (12), 4138-4144.
7. Krebs, M. R. H.; Devlin, G. L.; Donald, A. M., Protein particulates: Another generic form of protein aggregation? *Biophysical Journal* **2007**, 92, (4), 1336-1342.
8. Mossa, S.; Sciortino, F.; Tartaglia, P.; Zaccarelli, E., Ground-state clusters for short-range attractive and long-range repulsive potentials. *Langmuir* **2004**, 20, (24), 10756-10763.

9. Chiti, F.; Dobson, C. M., Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annual Review of Biochemistry* **2006**, 75, 333-366.
10. Qasba, P. K.; Kumar, S., Molecular divergence of lysozymes and alpha-lactalbumin. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **1997**, 32, (4), 255-306.
11. Kronman, M. J.; Sinha, S. K.; Brew, K., Characteristics of the binding of Ca^{2+} and other divalent metal-ions to bovine alpha-lactalbumin *Journal of Biological Chemistry* **1981**, 256, (16), 8582-8587.
12. Bushmarina, N. A.; Blanchet, C. E.; Vernier, G.; Forge, V., Cofactor effects on the protein folding reaction: Acceleration of alpha-lactalbumin refolding by metal ions. *Protein Science* **2006**, 15, (4), 659-671.
13. Hendrix, T.; Griko, Y. V.; Privalov, P. L., A calorimetric study of the influence of calcium on the stability of bovine alpha-lactalbumin. *Biophysical Chemistry* **2000**, 84, (1), 27-34.
14. Dolgikh, D. A.; Gilmanshin, R. I.; Brazhnikov, E. V.; Bychkova, V. E.; Semisotnov, G. V.; Venyaminov, S. Y.; Ptitsyn, O. B., Alpha-lactalbumin: compact state with fluctuating tertiary structure *Febs Letters* **1981**, 136, (2), 311-315.
15. Kuwajima, K., The molten globule state of alpha-lactalbumin. *Faseb Journal* **1996**, 10, (1), 102-109.
16. Troullier, A.; Reinstadler, D.; Dupont, Y.; Naumann, D.; Forge, V., Transient non-native secondary structures during the refolding of alpha-lactalbumin detected by infrared spectroscopy. *Nature Structural Biology* **2000**, 7, (1), 78-86.
17. Fink, A. L.; Calciano, L. J.; Goto, Y.; Kurotsu, T.; Palleros, D. R., Classification of acid denaturation of proteins: intermediates and unfolded states. *Biochemistry* **1994**, 33, (41), 12504-12511.
18. Shih, P.; Holland, D. R.; Kirsch, J. F., Thermal stability determinants of chicken egg-white lysozyme core mutants: hydrophobicity, packing volume, and conserved buried water-molecules. *Protein Science* **1995**, 4, (10), 2050-2062.
19. Howell, N. K.; Yeboah, N. A.; Lewis, D. F. V., Studies on the electrostatic interactions of lysozyme with alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin. *International Journal of Food Science and Technology* **1995**, 30, (6), 813-824.
20. Nigen, M.; Croguennec, T.; Bouhallab, S., Formation and stability of alpha-lactalbumin-lysozyme spherical particles: Involvement of electrostatic forces. *Food Hydrocolloids* **2009**, 23, (2), 510-518.
21. Nigen, M.; Croguennec, T.; Renard, D.; Bouhallab, S., Temperature affects the supramolecular structures resulting from alpha-lactalbumin-lysozyme interaction. *Biochemistry* **2007**, 46, (5), 1248-1255.
22. Nigen, M.; Le Tilly, V.; Croguennec, T.; Drouin-Kucma, D.; Bouhallab, S., Molecular interaction between apo or holo alpha-lactalbumin and lysozyme: Formation of heterodimers as assessed by fluorescence measurements. *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics* **2009**, 1794, (4), 709-715.
23. Persson, B. A.; Lund, M., Association and electrostatic steering of alpha-lactalbumin-lysozyme heterodimers. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2009**, 11, (39), 8879-8885.
24. Nigen, M.; Croguennec, T.; Madec, M. N.; Bouhallab, S., Apo alpha-lactalbumin and lysozyme are colocalized in their subsequently formed spherical supramolecular assembly. *Febs Journal* **2007**, 274, 6085-6093.
25. Akerud, T.; Thulin, E.; Van Etten, R. L.; Akke, M., Intramolecular dynamics of low molecular weight protein tyrosine phosphatase in monomer-dimer equilibrium studied by NMR: A model for changes in dynamics upon target binding. *Journal of Molecular Biology* **2002**, 322, (1), 137-152.
26. Garrett, D. S.; Seok, Y. J.; Peterkofsky, A.; Clore, G. M.; Gronenborn, A. M., Identification by NMR of the binding surface for the histidine-containing phosphocarrier protein HPr on the N-terminal domain of enzyme I of the Escherichia coli phosphotransferase system. *Biochemistry* **1997**, 36, (15), 4393-4398.
27. McKenna, S.; Moraes, T.; Pastushok, L.; Ptak, C.; Xiao, W.; Spyropoulos, L.; Ellison, M. J., An NMR-based model of the ubiquitin-bound human ubiquitin conjugation complex Mms2 center dot Ubc13 - The structural basis for lysine 63 chain catalysis. *Journal of Biological Chemistry* **2003**, 278, (15), 13151-13158.
28. Van Nuland, N. A. J.; Kroon, G. J. A.; Dijkstra, K.; Wolters, G. K.; Scheek, R. M.; Robillard, G. T., The NMR determination of the IIA-mtl binding site on HPr of the Escherichia coli phosphoenol pyruvate-dependent phosphotransferase system. *FEBS Letters* **1993**, 315, (1), 11-15.
29. Shuker, S. B.; Hajduk, P. J.; Meadows, R. P.; Fesik, S. W., Discovering high-affinity ligands for proteins: SAR by NMR. *Science* **1996**, 274, (5292), 1531-1534.
30. Lepre, C. A.; Moore, J. M.; Peng, J. W., Theory and applications of NMR-based screening in pharmaceutical research. *Chemical Reviews* **2004**, 104, (8), 3641-3675.
31. Oltersdorf, T.; Elmore, S. W.; Shoemaker, A. R.; Armstrong, R. C.; Augeri, D. J.; Belli, B. A.; Bruncko, M.; Deckwerth, T. L.; Dinges, J.; Hajduk, P. J.; Joseph, M. K.; Kitada, S.; Korsmeyer, S. J.; Kunzer, A. R.; Letai, A.; Li, C.; Mitten, M. J.; Nettesheim, D. G.; Ng, S.; Nimmer, P. M.; O'Connor, J. M.; Oleksijew, A.; Petros, A. M.; Reed, J. C.; Shen, W.; Tahir, S. K.; Thompson, C. B.; Tomaselli, K. J.; Wang, B. L.; Wendt, M. D.; Zhang, H. C.; Fesik, S. W.; Rosenberg, S. H., An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature* **2005**, 435, (7042), 677-681.

32. Caussin, F.; Famelart, M. H.; Maubois, J. L.; Bouhallab, S., Mineral modulation of thermal aggregation and gelation of whey proteins: from beta-lactoglobulin model system to whey protein isolate. *Lait* **2003**, 83, (5), 1-12.
33. Schlörb, C.; Ackermann, K.; Richter, C.; Wirmer, J.; Schwalbe, H., Heterologous expression of hen egg white lysozyme and resonance assignment of tryptophan side chains in its non-native states. *Journal of Biomolecular Nmr* **2005**, 33, (2), 95-104.
34. Grobler, J. A.; Wang, M.; Pike, A. C. W.; Brew, K., Study by mutagenesis of the roles of 2 aromatic clusters of alpha-lactalbumin in aspects of its action in the lactose synthase system *Journal of Biological Chemistry* **1994**, 269, (7), 5106-5114.
35. Schanda, P.; Brutscher, B., Very fast two-dimensional NMR spectroscopy for real-time investigation of dynamic events in proteins on the time scale of seconds. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, 127, (22), 8014-8015.
36. Delaglio, F.; Grzesiek, S.; Vuister, G. W.; Zhu, G.; Pfeifer, J.; Bax, A., NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes *Journal of Biomolecular Nmr* **1995**, 6, (3), 277-293.
37. Johnson, B. A.; Blevins, R. A., NMRView: a computer program for the visualization and analysis of NMR data. *Journal of Biomolecular Nmr* **1994**, 4, (5), 603-614.
38. Schumann, F.; Riepl, H.; Maurer, T.; Gronwald, W.; Neidig, K.-P.; Kalbitzer, H., Combined chemical shift changes and amino acid specific chemical shift mapping of protein-protein interactions. *Journal of Biomolecular Nmr* **2007**, 39, (4), 275-289.
39. Fielding, L., NMR methods for the determination of protein-ligand dissociation constants. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **2007**, 51, (4), 219-242.
40. Forge, V.; Mintz, E.; Guillain, F., Ca²⁺ binding to sarcoplasmic reticulum ATPase revisited. I. Mechanism of affinity and cooperativity modulation by H⁺ and Mg²⁺. *Journal of Biological Chemistry* **1993**, 268, (15), 10953-10960.
41. Lund, M.; Trulsson, M.; Persson, B., Faunus: An object oriented framework for molecular simulation. *Source Code Biol Med* **2008**, 3, 1.
42. Alexandrescu, A. T.; Evans, P. A.; Pitkeathly, M.; Baum, J.; Dobson, C. M., Structure and dynamics of the acid-denatured molten globule state of alpha-lactalbumin: a 2-dimensional NMR study *Biochemistry* **1993**, 32, (7), 1707-1718.
43. Roberts, G. C. K., *The Determination of Equilibrium Dissociation Constants of Protein-Ligand Complexes by NMR*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: 2003; p 309-319.
44. Rule, G.; Hitchens, T., *Fundamentals of protein NMR spectroscopy*. Springer: 2006.
45. Buchko, G. W.; Tarasevich, B. J.; Bekhazi, J.; Snead, M. L.; Shaw, W. J., A Solution NMR Investigation into the Early Events of Amelogenin Nanosphere Self-Assembly Initiated with Sodium Chloride or Calcium Chloride†. *Biochemistry* **2008**, 47, (50), 13215-13222.
46. Vaynberg, J.; Qin, J., Weak protein-protein interactions as probed by NMR spectroscopy. *Trends in Biotechnology* **2006**, 24, (1), 22-27.
47. Crowley, P. B.; Ubbink, M., Close encounters of the transient kind: Protein interactions in the photosynthetic redox chain investigated by NMR spectroscopy. *Accounts of Chemical Research* **2003**, 36, (10), 723-730.
48. Zuiderweg, E. R. P., Mapping protein-protein interactions in solution by NMR Spectroscopy. *Biochemistry* **2002**, 41, (1), 1-7.
49. Balbach, J.; Forge, V.; Lau, W. S.; Jones, J. A.; VanNuland, N. A. J.; Dobson, C. M., Detection of residue contacts in a protein folding intermediate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1997**, 94, (14), 7182-7185.
50. Kataoka, M.; Tokunaga, F.; Kuwajima, K.; Goto, Y., Structural characterization of the molten globule of α-lactalbumin by solution X-ray scattering. *Protein Science* **1997**, 6, (2), 422-430.

1.4. Structure tridimensionnelle du dimère holoLAC-LYS

Nous avons déterminé les acides aminés de l'holo α -lactalbumine impliqués dans les interactions avec le lysozyme et ceux du lysozyme en interaction avec l'holo α -lactalbumine. Ces acides aminés sont dits « actifs ». Cependant la méthode du « chemical shift mapping » ne donne aucune information sur les contacts entre résidus actifs, i.e. elle ne permet pas de savoir quels acides aminés actifs de l' α -lactalbumine interagissent avec ceux du lysozyme. Afin de proposer une structure tridimensionnelle du dimère holoLAC-LYS, les acides aminés actifs identifiés par RMN ont été implémentés dans le programme HADDOCK (*Dominguez et al. 2003*). Ce programme de « docking » considère ces données expérimentales comme des contraintes d'interaction ambiguës (AIR pour Ambiguous Interactions Restraints). Il calcule les conformations de dimère de plus basse énergie en imposant une distance maximale de 4 Å entre les atomes des acides aminés actifs de chacune des protéines. Dans le cas du lysozyme, seuls les acides aminés actifs présentant une constante de dissociation (293 μ M) similaire à celle déterminée à partir des acides aminés actifs de l'holo α -lactalbumine (320 μ M) ont été considérés. Parmi l'ensemble des structures proposées par HADDOCK, celle présentant le meilleur score, c'est-à-dire celle de la plus basse énergie est présentée en Figure 1-2.

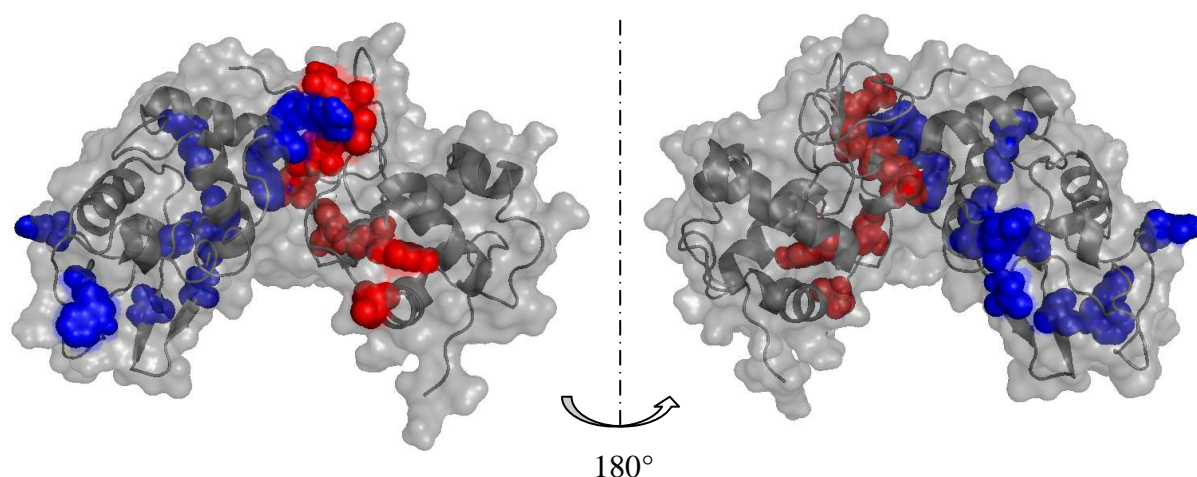


Figure 1-2 : Représentation tridimensionnelle d'une structure du dimère holo α -lactalbumine-lysozyme. Structure de plus basse énergie proposée par HADDOCK avec un rmsd de 1.0 ± 0.7 Å (root mean square deviation). Les résidus actifs de l'holo α -lactalbumine sont représentés en rouge et ceux de lysozyme en bleu.

Malgré des résultats satisfaisants du point de vue informatique (bon score HADDOCK et un rmsd de 1 Å, pour root mean square deviation), tous les acides aminés actifs ne sont pas présents à l'interface dans cette structure du dimère holoLAC-LYS. Seuls les acides aminés actifs localisés dans le domaine β de l'holo α -lactalbumine et ceux localisés dans la région N-terminale du lysozyme sont contenus dans l'interface. Comme expliqué dans l'article, les expériences de simulation par modélisation moléculaire utilisant la méthode du Monte Carlo ont montré que la spécificité de l'interaction était faible. La combinaison de ces simulations à ceux obtenus expérimentalement suggère que plusieurs conformations de dimère sont possibles. La structure obtenue par « docking » ne représente probablement qu'une conformation possible.

1.5. Accessibilité et nature des acides aminés impliqués dans les interactions

1.5.1. Accessibilité des acides aminés actifs

L'accessibilité des résidus actifs identifiés par RMN a été évaluée par le logiciel Accelrys (Accelrys Software Inc., San Diego). Les valeurs s'échelonnent de 0 à 10 pour les résidus non accessibles et de 10 à 75 pour les résidus accessibles totalement ou partiellement (une partie de leur chaîne latérale et/ou principale) (Tableau S2, Article 1). Ainsi, nous avons constaté que 60 à 70% des acides aminés actifs sont accessibles à la surface de la protéine. Les acides aminés actifs non accessibles sont proches spatialement des acides aminés actifs accessibles et les modifications d'environnement électronique engendrées par l'interaction des derniers peut entraîner une perturbation des acides aminés les plus proches (*Zuiderweg 2002*). D'autre part cette analyse considère la protéine comme une molécule rigide (structure cristallographique) mais l'interaction peut engendrer des adaptations conformationnelles subtiles de la protéine et exposer partiellement au solvant des résidus proches de la surface. Ces deux éléments peuvent expliquer pourquoi certains acides aminés à priori non exposés à la surface de la protéine ont été identifiés comme impliqués dans l'interaction.

1.5.2. Nature des acides aminés actifs accessibles

Le potentiel électrostatique des protéines a été calculé à pH 7.5 et 39 mM de force ionique avec le programme Delphi (inclut dans le logiciel Accelrys Molecular Graphics System). La comparaison des surfaces électrostatiques avec les régions en interaction déterminées par RMN (Figures 1-3A et B) montre que la plupart des acides aminés actifs de l'holo α -lactalbumine est située dans des patchs négatifs alors que les acides aminés actifs du lysozyme sont majoritairement localisés dans des patchs positifs. La formation des dimères est donc principalement gouvernée par des interactions électrostatiques attractives avec neutralisation des charges complémentaires portées à la surface des protéines.

De plus, la répartition hétérogène des charges négatives à la surface de l' α -lactalbumine induit un moment dipolaire plus élevé pour cette protéine que pour le lysozyme dont la répartition des charges positives est homogène (*Persson and Lund 2009*). Cette différence de moment dipolaire résulte en une orientation préférentielle des protéines. Ces interactions électrostatiques s'exercent à longue distance et gouvernent le rapprochement des deux protéines.

Si on s'intéresse à la nature des acides aminés actifs accessibles (Figure 1-3C) dans le dimère holoLAC-LYS, on remarque que seulement un acide aminé de l'holo α -lactalbumine est chargé négativement (D78, représenté en rouge) et deux acides aminés du lysozyme sont chargés positivement (K33 et R125, représentés en bleu). Les autres acides aminés actifs sont des résidus polaires (T4, Q43 de l' α -lactalbumine et S36, N37, Q41, T43, N77, N103 du lysozyme, représentés en verts) ou composés de chaînes latérales aliphatiques et hydrophobes (I41, V42 de l' α -lactalbumine, W62, A122, W123 du lysozyme, représentés en orange). Les résidus chargés et polaires peuvent être impliqués respectivement dans la formation de ponts salins et de liaisons hydrogènes et les résidus apolaires établir des interactions hydrophobes. L'ensemble de ces résidus peut également établir des interactions de van der Waals.

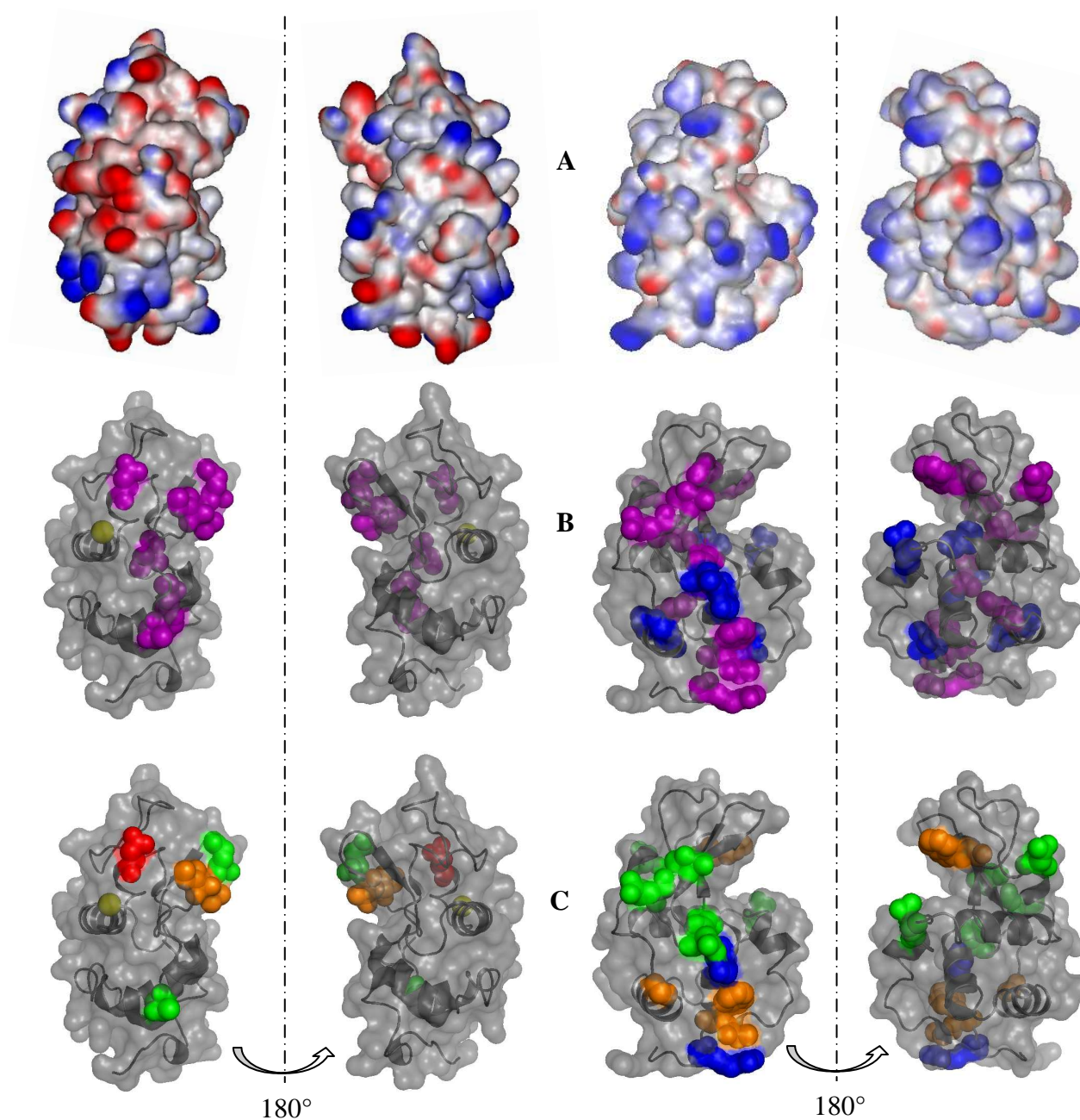


Figure 1-3 : Structure tridimensionnelle de l'holo α -lactalbumine (**gauche**) et du lysozyme (**droite**). **A :** Potentiel électrostatique de surface calculé avec Accelrys (pH 7.5, 39 mM de force ionique) **B :** acides aminés actifs du dimère holoLAC-LYS ($K_d \sim 300 \mu\text{M}$: violet et $K_d 725 \mu\text{M}$: bleu), **C :** acides aminés actifs accessibles chargés négativement (rouge), positivement (bleu), polaires (verts) et apolaires (orange).

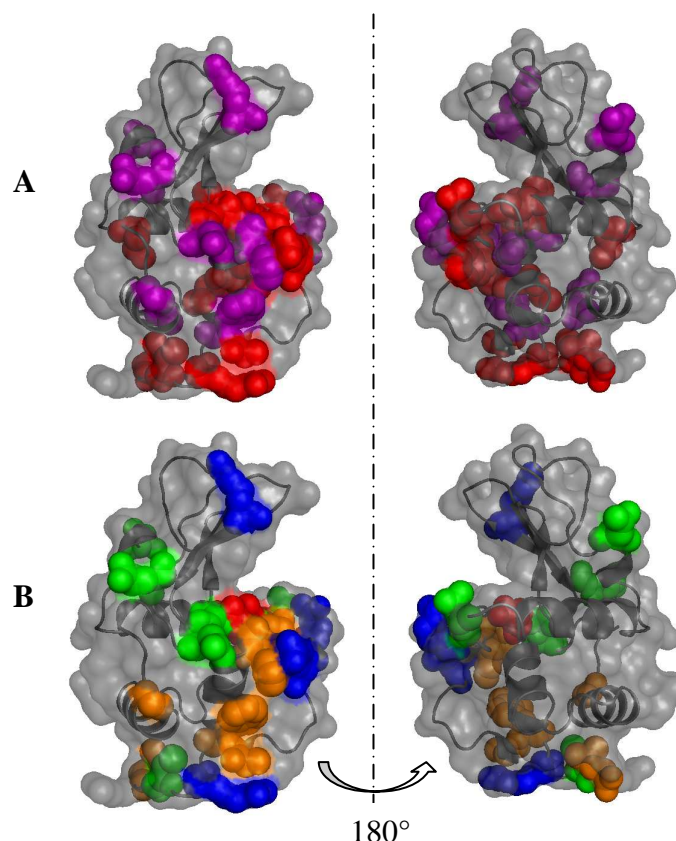


Figure 1-4 : Structure tridimensionnelle du lysozyme. **A :** acides aminés actifs en interaction avec l'apo α -lactalbumine présentant un K_d de 390 μM (en violet) et ceux réagissant selon un procédé coopératif (rouge), **B :** acides aminés actifs accessibles chargés négativement (rouge), positivement (bleu), polaires (verts) et apolaires (orange).

Pour le dimère apoLAC-LYS nous avons seulement déterminé la surface d'interaction du lysozyme. Elle est localisée dans une région comparable à sa surface d'interaction avec la forme holo. Cependant elle est élargie par des résidus actifs supplémentaires (Figure 1-4). Ceux-ci sont des acides aminés chargés positivement (R45 dans le domaine β , R112 et R114 dans le domaine α et négativement (E35) et des résidus hydrophobes (F34, A110 et L129). Cette observation appuie les deux hypothèses formulées pour expliquer l'élargissement de la surface d'interaction lorsque le lysozyme interagit avec la forme apo : (i) l'apo α -lactalbumine peut établir des interactions hydrophobes du fait de l'exposition partielle de résidus apolaires à sa surface et (ii) le site de fixation du calcium de l' α -lactalbumine constitue un deuxième site d'interaction en impliquant les charges négatives non neutralisées en absence de calcium.

En conclusion, la reconnaissance moléculaire est principalement gouvernée par des interactions électrostatiques mais la stabilisation de l'interface des hétérodimères implique probablement d'autres types d'interactions de faible énergie s'établissant à courte distance.

1.6. Identification des acides aminés de l'apo α -lactalbumine impliqués dans les interactions avec le lysozyme à 20°C

Dans le cas de l'hétérodimère apo α -lactalbumine-lysozyme, seule la surface d'interaction du lysozyme a pu être identifiée. En effet, à la température favorable à la formation des microsphères (45°C), l'apo α -lactalbumine est dans son état « molten globule » qui est caractérisé par une flexibilité importante du fait de l'absence de structure tertiaire stable. Cette caractéristique se traduit sur le spectre RMN de la ^{15}N -apo α -lactalbumine par un regroupement des pics croisés dans une région confinée du spectre (*Alexandrescu et al. 1993*) (Figure 1-5A). C'est pourquoi la méthode de perturbation des déplacements chimiques n'a pu être utilisée pour déterminer sa surface d'interaction avec le lysozyme.

Pour tenter d'obtenir cette information, nous avons réalisé des expériences de titration à 20°C. En effet, l'apo α -lactalbumine est dans sa conformation native à cette température et son spectre RMN est résolu (Figure 1-5B).

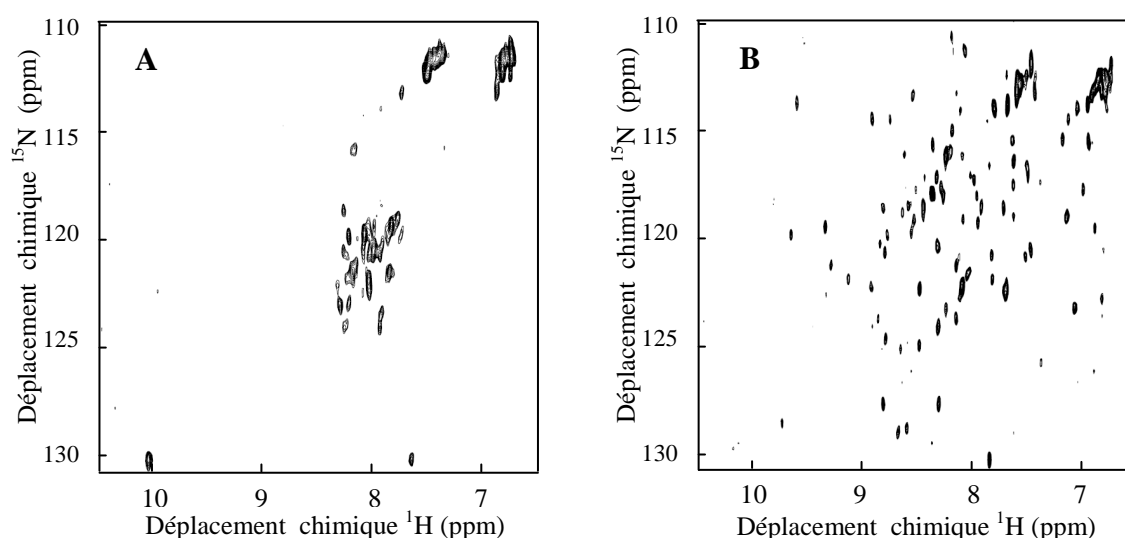


Figure 1-5 : Spectre ^1H - ^{15}N HMQC d'apo ^{15}N - α -lactalbumine à 45°C (A) et 20°C (B) obtenus pour une solution à 10 μM dans 30 mM Tris-HCl contenant 15 mM NaCl et 10% v/v D_2O .

Nous avons dans un premier temps réalisé la titration de l'apo ^{15}N - α -lactalbumine par du lysozyme non marqué à 20°C dans un tampon de force ionique égale à 39 mM.

La Figure 1-6 compare l'évolution de l'intensité mesurée (triangle rouge) à celles observées lors de la titration du ^{15}N -lysozyme par la forme apo à 45°C (triangle blanc, Figure 2c, Article 1) et lors des titrations réalisées pour la caractérisation du dimère holoLAC-LYS (rond blanc) (Figure 2a&b, Article 1).

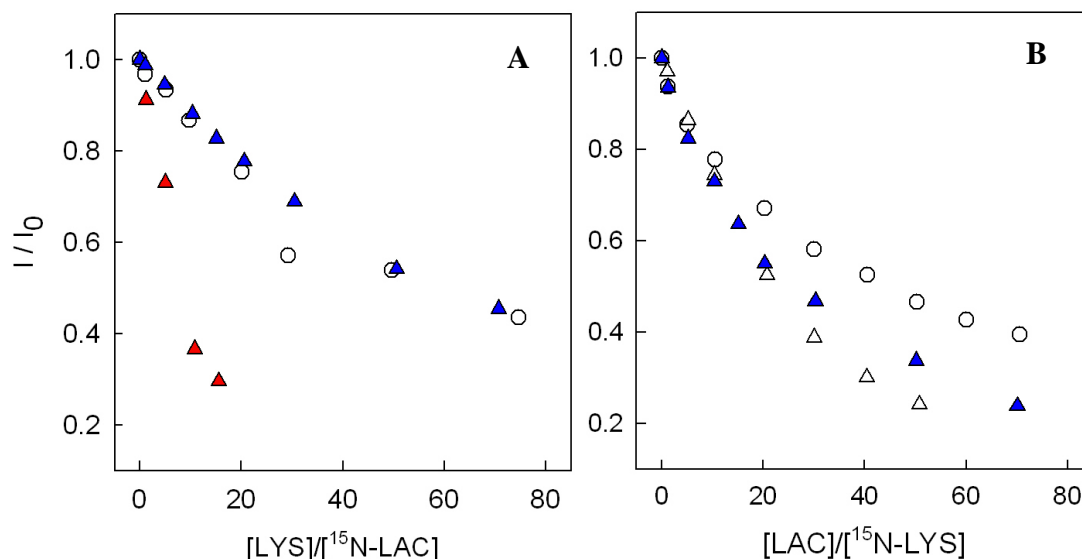


Figure 1-6 : Evolution de l'intensité totale des spectres RMN lors des titrations de la ^{15}N - α -lactalbumine par du lysozyme non marqué (**A**) et des titrations du ^{15}N -lysozyme par l' α -lactalbumine non marquée (**B**). Titrations dans le cas du dimère holo α -lactalbumine-lysozyme (ronds) et dans le cas du dimère apo α -lactalbumine-lysozyme (triangles) réalisées à 45°C et 39 mM de force ionique (blanc) et à 20°C et 39 mM de force ionique (rouge) et 20°C et à 124 mM de force ionique (bleu).

A 20°C et 39 mM de force ionique, une diminution importante d'intensité a entraîné une perte de signal pour un rapport molaire en protéine inférieur à 20. Comme expliqué dans le cas de la titration du ^{15}N -lysozyme par l'apo α -lactalbumine à 45°C cette diminution d'intensité est probablement due à l'oligomérisation des hétérodimères. Cependant, à 20°C l'intensité du spectre de référence de la ^{15}N -apo α -lactalbumine était inférieure à celle mesurée pour le ^{15}N -lysozyme à 45°C. En effet, à une même force ionique, la qualité du signal RMN est réduite par diminution de la température (*Kwan et al. 2011*). C'est pourquoi, la perte du signal a été observée pour des rapports molaires en protéine plus faibles et les quelques points de titration enregistrés ne nous ont pas permis d'identifier les acides aminés de l'apo α -lactalbumine impliqués dans l'interaction.

En s’inspirant des constantes de dissociations déterminées par anisotropie de fluorescence (Tableau 1-1) à différentes températures et forces ioniques, nous avons décidé d’augmenter la force ionique dans le but de réduire l’assemblage tout en formant des dimères.

dimère	$K_d (*10^{-6} \text{ M})$		
	I = 39 mM		I = 124 mM
	T = 10°C	T = 45°C	T = 45°C
holoLAC-LYS	5.0 ± 1	16.3 ± 3.4	390
apoLAC-LYS	5.6 ± 0.4	26.4 ± 6.4	160

Tableau 1-1: Constantes de dissociation de l’ α -lactalbumine et du lysozyme en fonction de la force ionique (I) et de la température déterminées par anisotropie de fluorescence lors de la titration de 1 μM de protéine par son partenaire. (*Nigen et al. 2009*)

Lorsque l’on compare les valeurs de constantes de dissociation déterminées par RMN ($\sim 300 \mu\text{M}$) avec celles précédemment obtenues par anisotropie de fluorescence dans les mêmes conditions physico-chimiques (45°C et 39 mM de force ionique), on s’aperçoit qu’elles sont 15 à 20 fois plus élevées. Les seules différences notables sont d’une part la concentration en protéine titrée (10 μM par RMN et 1 μM par fluorescence) et d’autre part l’utilisation d’une protéine marquée par RMN et la fixation d’une sonde fluorescence pour les mesures d’anisotropie. A 10 μM , l’oligomérisation des hétérodimères apoLAC-LYS pourrait expliquer une variation de la constante apparente de dissociation propre aux dimères. Cependant, cette hypothèse a été exclue car les hétérodimères holoLAC-LYS ne s’assemblent pas dans ces conditions. D’autre part, il est peu probable que le marquage à l’azote 15 modifie la réactivité des protéines, par contre la sonde fluorescente peut augmenter les interactions hydrophobes non spécifiques. Dans ce cas les constantes apparentes déterminées par anisotropie de fluorescence auraient été sous-estimées.

Malgré ces différences, les expériences d’anisotropie de fluorescence nous indiquent l’influence de la température et de la force ionique sur l’affinité des protéines et les valeurs relatives montrent qu’une augmentation de la force ionique diminue l’affinité des deux protéines et peut donc être utilisée pour réduire leur assemblage.

Nous avons vérifié notre hypothèse de travail par des mesures de turbidité en réalisant des titrations avec des protéines non marquées (Figure 1-7).

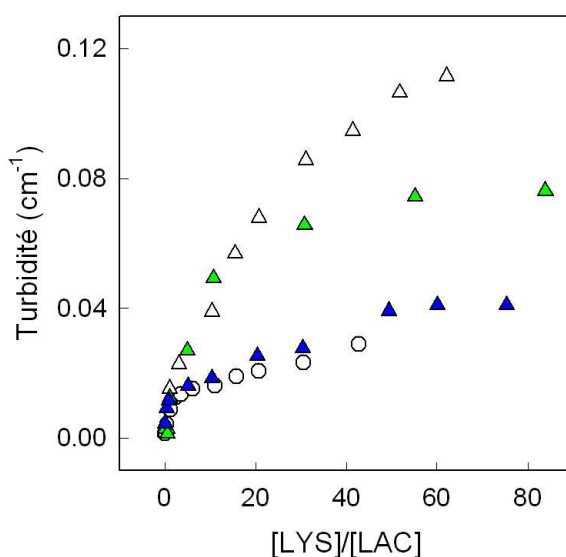


Figure 1-7 : Evolution de la turbidité en fonction de la force ionique (I) lors de la titration de 10 μ M d'holo (rond) et d'apo α -lactalbumine (triangle) par du lysozyme à 45°C, I= 39 mM (blanc), à 20°C, I= 75 mM (vert) et 20°C, I= 124 mM (bleu).

Comme attendu, l'augmentation de la turbidité est réduite lorsque la force ionique augmente. Bien que les valeurs de turbidité obtenues soient très faibles (des valeurs de turbidité comprises entre 0 et 0.12 correspondent à une densité optique à 600 nm comprise entre 0 et 0.06), une augmentation de celle-ci est observée lorsque la quantité de lysozyme ajoutée augmente. Les variations observées sont donc significatives et résultent de l'assemblage du lysozyme avec l' α -lactalbumine puisque la turbidité de solutions pures de lysozyme aux concentrations utilisées est nulle.

L'évolution de la turbidité lors de la titration de l'apo α -lactalbumine à 20°C et 124 mM de force ionique est comparable à celle observée à 45°C et 39 mM de force ionique avec la forme holo de l' α -lactalbumine. Or, dans ces conditions, malgré cette légère augmentation de turbidité, les dimères holoLAC-LYS ont été caractérisés avec succès par RMN.

Nous avons donc réalisés la titration de ^{15}N -apo α -lactalbumine par le lysozyme à 20°C dans un tampon de force ionique égale à 124 mM, ainsi que la titration inverse du ^{15}N -lysozyme. Dans ces conditions, la diminution d'intensité des spectres RMN mesurée (Figure 1-6, triangle bleu) est comparable à celle observée lors des titrations réalisées pour la caractérisation du dimère holoLAC-LYS à 45°C et 39 mM de force ionique (Figure 1-6, ronds blancs). Il y a donc bien formation de dimères.

Cependant, à 20°C et 124 mM de force ionique, les variations de déplacements chimiques mesurées sont très faibles (< 0.02 ppm) et aucun acide aminé ne présente de variation de déplacements chimiques significativement supérieure au bruit. Dans ces conditions, la constante de dissociation est probablement trop élevée pour pouvoir mesurer des variations de déplacements chimiques significatives et donc déterminer les acides aminés impliqués dans les interactions. Les déplacements chimiques mesurés à 45°C et 39 mM de force ionique (Figures 4a, 6a&c, Article 1) étaient déjà faibles, de 0.02 à 0.08 ppm, alors que l'affinité est plus grande, d'au moins un ordre de grandeur. En effet, compte tenu des faibles différences d'affinité à 39 mM de force ionique entre 10 et 45°C (Tableau 1-1), il est raisonnable de considérer que l'affinité à 124 mM de force ionique et 20°C est comparable à celle mesurée à 45°C.

En définitive, bien qu'un spectre RMN résolu d'apo α -lactalbumine soit obtenu à 20°C, nous n'avons pas identifié les acides aminés de l'apo α -lactalbumine en interaction avec le lysozyme, du fait de leur assemblage spontané à 39 mM de force ionique et de la limite de sensibilité de cette technique pour des constantes d'affinité relativement faible (à 124 mM de force ionique).

1.7. Conclusions du Chapitre 1 et perspectives

L'utilisation de la méthode du « chemical shift mapping » nous a permis de caractériser les interfaces des dimères holoLAC-LYS et apoLAC-LYS dans les conditions physico-chimiques favorables à la formation des microsphères. La surface d'interaction de l'apo α -lactalbumine avec le lysozyme n'a pu être déterminée mais cette limitation a été levée en réalisant une étude comparative des deux dimères. En effet, bien que les dimères holoLAC-LYS ne s'assemblent pas en objets supramoléculaires, la caractérisation de leur interface nous a apporté des informations précieuses pour comprendre le mécanisme de formation des unités élémentaires des microsphères.

Le rapprochement des deux protéines est principalement gouverné par des interactions électrostatiques s'exerçant à longue distance. De plus, la répartition des charges à la surface des protéines guide l'orientation mutuelle des deux protéines. Le lysozyme est préférentiellement attiré vers un patch négatif à la surface de l'holo α -lactalbumine alors que la fixation des deux formes de l' α -lactalbumine à la surface du lysozyme est beaucoup moins spécifique. Plusieurs conformations de dimères semblent donc exister. D'autre part, les hétérodimères sont des complexes transitoires présentant une faible stabilité et n'impliquent pas de changements conformationnels des protéines. L'holo α -lactalbumine et le lysozyme conservent leur conformation native et l'apo α -lactalbumine semble également conserver sa conformation « molten globule ».

Bien que les surfaces d'interaction du lysozyme avec les formes holo et apo de l' α -lactalbumine soient comparables, son interaction avec l'apo α -lactalbumine implique un second évènement de fixation. En effet des résidus supplémentaires interagissent selon un processus coopératif et sont impliqués dans un deuxième site d'interaction. Celui-ci réagit probablement avec le site de fixation du calcium de l' α -lactalbumine dont les charges négatives ne sont pas neutralisées à la surface de la forme apo. Ainsi nous proposons la formation de tétramères par dimérisation des hétérodimères apoLAC-LYS.

Pour confirmer les deux hypothèses concernant les sites d'interaction du molten globule de l'apo α -lactalbumine : (i) les acides aminés actifs sont identiques à ceux de l'holo α -lactalbumine et (ii) les atomes du site de calcium sont impliqués dans le site de tétramérisation, nous pouvons envisager d'utiliser la mutagenèse dirigée sur cette protéine et de quantifier l'effet des mutations sur l'interaction en observant les différences sur le spectre

du lysozyme marqué. On peut également envisager de muter certains acides aminés actifs du lysozyme qui sont impliqués dans les interactions secondaires avec l'apo α -lactalbumine afin d'évaluer leur rôle dans la formation des tétramères.

Pour compléter cette étude, il serait également intéressant de mettre en évidence la formation des tétramères en réalisant, par exemple, des expériences RMN homonucléaire de relaxation ou de diffusion. En effet ces expériences mesurent la taille des objets formés en utilisant respectivement la diminution du temps de corrélation rotationnel (*Rule and Hitchens 2006*) et la diminution du coefficient de diffusion translationnelle (*Dingley et al. 1995; Price 2006*) des molécules de taille croissante. En se plaçant dans des conditions optimales pour former un maximum de dimères, il est cependant probable que la quantité de tétramère formée ne soit pas suffisante pour permettre leur détection. Cependant une dépendance en concentration totale en protéines (de 10 μ M à quelques centaines de μ M) pourrait être réalisée pour mettre en évidence la formation des oligomères de taille croissante.

Enfin, pour obtenir des informations concernant les contacts entre résidus actifs des protéines, il est possible de réaliser des expériences de transfert croisé d'aimantation. Cette approche consiste à détecter sélectivement les transferts d'aimantation intermoléculaires par couplage dipolaire, i.e. entre protons proches spatialement (distants de moins de 5 Å) (*Meyer et al. 2003*). C'est l'effet NOE pour Effet Overhauser Nucléaire. Le principe est le suivant : une des deux protéines est doublement marquée ^{15}N , ^{13}C et c'est la protéine non marquée qui est sélectivement irradiée. Cette aimantation est transférée sur la protéine marquée au niveau des protons des acides aminés composant sa surface d'interaction. L'acquisition de spectres NOESY tridimensionnels (pour Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) permet de déterminer les protons impliqués dans l'interface (*Clore and Gronenborn 1998; Takeuchi and Wagner 2006; Vaynberg and Qin 2006*). En effet, les effets NOE intramoléculaires sont filtrés et seuls les NOE intermoléculaires sont détectés. Cependant l'interprétation de ces expériences est fastidieuse car elle nécessite la connaissance de l'attribution des chaînes latérales. D'autre part, les effets NOE collectés peuvent être nombreux puisque plusieurs conformations de dimères semblent exister.

2. Caractérisation des interactions à l'échelle moléculaire au sein des microsphères

Afin de mieux comprendre la stabilité des microsphères résultant de l'assemblage de l'apo α -lactalbumine et du lysozyme, les travaux présentés dans ce chapitre visent à caractériser les interactions au sein de ces objets supramoléculaires.

Pour ce faire, nous avons cherché à répondre aux questions suivantes :

- Quelles sont les régions des protéines impliquées dans les interactions au sein de ces objets ?
- Les protéines assemblées présentent-elles des changements de structure secondaire ?

L'assemblage de protéines en objets supramoléculaires ordonnés peut induire la formation de structures secondaires non natives. Comme nous l'avons décrit dans l'étude bibliographique, la formation de fibres amyloïdes et de certains gels particuliers implique la conversion de structures secondaires natives en feuillets β intermoléculaires. Ces modifications structurales sont favorisées lorsque la protéine est dans un état partiellement déplié. Or la formation des microsphères est favorisée lorsque l'apo α -lactalbumine est dans son état « molten globule » à 45°C alors que des agrégats amorphes non ordonnés sont formés à 20°C lorsque cette protéine est dans sa conformation native.

Pour sonder les éventuels changements de structure secondaire nous avons utilisé la spectroscopie infrarouge et les cinétiques d'échanges hydrogène/deutérium. Après avoir présenté ces deux techniques, nous exposerons les difficultés et les limites rencontrées et enfin, nous présenterons les résultats obtenus par spectroscopie infrarouge.

2.1. Approches expérimentales pour l'étude des interactions au sein des microsphères

2.1.1. Quantification des changements de structure secondaire par spectroscopie infrarouge

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) est particulièrement adaptée pour étudier les structures secondaires des protéines car elle permet d'accéder à chaque type de structure secondaire présent. En effet, une des bandes d'absorption caractéristiques des vibrations des groupes amides est la bande amide I située entre 1700-1600 cm^{-1} . Elle contient 80% des fréquences de vibrations d'élongation du groupement carbonyle de la liaison peptidique. Puisque ces groupements sont impliqués dans les liaisons hydrogènes qui stabilisent les structures secondaires, l'intensité et la position de la bande amide I renseigne sur la quantité de structure secondaire. Cette bande est composée de plusieurs composantes se chevauchant et représentant chacune un type de structure secondaire. Des traitements mathématiques de la bande amide I tels que sa déconvolution ou sa dérivée seconde permettent de séparer ces composantes et de quantifier chaque élément de structure secondaire présent.

De plus la spectroscopie infrarouge, contrairement à d'autres techniques spectroscopiques utilisées pour l'étude structurale de protéines, telle que le dichroïsme circulaire, est peu sensible à la turbidité du milieu (*Surewicz et al. 1993*). Les objets supramoléculaires formés par assemblage de protéines peuvent donc être directement détectés pour évaluer la conversion de structures secondaires natives et l'apparence de structures secondaires non natives des protéines contenues dans ces objets. De plus, lorsqu'un mélange binaire de protéine est étudié, l'utilisation d'une protéine marquée au carbone 13 permet de distinguer les deux protéines en mélange, puisque la bande amide I de la protéine marquée est déplacée d'environ 50 cm^{-1} . La seule contrainte de cette méthode est la nécessité de travailler en milieu deutéré pour s'affranchir du signal infrarouge des molécules d'eau. Il faut donc préalablement s'assurer de l'intégrité des objets supramoléculaires formés dans un tampon deutéré et éventuellement ajuster les conditions physico-chimiques.

2.1.2. Etude des interactions protéine-protéine par la méthode des échanges hydrogène/deutérium

Nous avons également envisagé d'appliquer la méthode des cinétiques d'échange hydrogène/deutérium car lorsque celles-ci sont suivies par RMN, cette méthode permet d'obtenir des informations à l'échelle du résidu et de caractériser des changements de structure plus fins que par spectroscopie infrarouge.

Le principe de la méthode des échanges hydrogène/deutérium est le suivant : lorsqu'une protéine est placée dans un solvant deutéré, les protons labiles (protons amides et protons des chaînes latérales) vont échanger avec les deutérons du solvant. La vitesse d'échange des protons des chaînes latérales est trop rapide pour être mesurée contrairement à celle des protons amides. Leur vitesse d'échange dépend de leur accessibilité au solvant et donc de leur localisation dans la structure de la protéine. Les protons amides impliqués dans la stabilisation de structures secondaires (liaisons hydrogènes) ou enfouis dans le cœur hydrophobe de la protéine ont une vitesse d'échange plus faible que les protons amides des résidus exposés en surface.

L'hydrogène et le deutérium sont deux isotopes présentant des masses moléculaires et des propriétés magnétiques différentes. Les cinétiques d'échange peuvent donc être suivies par spectroscopie infrarouge, spectrométrie de masse et RMN. La spectroscopie infrarouge et la spectrométrie de masse ne sont pas aussi résolutive que la RMN puisqu'elles permettent de mesurer des vitesses d'échanges pour la protéine entière ou des fragments de quelques résidus obtenus par digestion enzymatique (*Chung et al. 1997; Englander 2006; Vrettos and Meuse 2009*), alors que la RMN permet de mesurer la vitesse d'échange pour chaque acide aminé. Le facteur de protection de chaque acide aminé permet de quantifier son accessibilité au solvant et est calculé à partir des vitesses d'échange mesurées.

La méthode des échanges hydrogène/deutérium est une méthode très sensible utilisée pour étudier le repliement des protéines (*Forge et al. 1999; Englander 2000*) et les interactions impliquant une protéine, telles que les interactions protéine-membrane (*Chenal et al. 2005; Man et al. 2007*). En effet, les interactions protéiques peuvent mener à un dépliement local d'une structure secondaire qui résulte en une diminution du facteur de protection des acides aminés impliqués et/ou à la formation d'éléments de structure secondaire non natifs résultant en une augmentation du facteur de protection (*Engen and*

Smith 2000). Ainsi, la comparaison du profil de protection (facteurs de protection en fonction de la séquence de la protéine) de la protéine en interaction avec celui de la protéine dans sa conformation native permet d'identifier les zones d'interaction.

L'adaptation de cette méthode à notre système a consisté à déterminer le protocole adéquat pour initier les échanges ainsi que les conditions physico-chimiques permettant de simultanément stopper les échanges et déstabiliser les microsphères afin de récupérer les protéines en solution dans leur conformation native. En effet, les protéines assemblées ne peuvent être détectées par RMN et seuls les spectres RMN des protéines dans leur conformation native peuvent être exploités. D'autre part nous avons vérifié les deux hypothèses de travail sur lesquelles réside l'utilisation de cette méthode : (i) les protéines assemblées sont accessibles au solvant, i.e. le solvant diffuse dans les microsphères et (ii) les protéines assemblées échangent plus lentement que les protéines natives en solution.

2.2. Les cinétiques d'échange hydrogène/deutérium

2.2.1. Initiation des échanges hydrogène/deutérium

Comme expliqué précédemment, le principe des échanges hydrogène/deutérium est de placer les protéines hydrogénées dans un milieu deutéré et de quantifier les vitesses d'échanges des protons amides avec les deutérons du solvant. Deux méthodes ont été envisagées pour initier les échanges : les microsphères obtenues dans un milieu aqueux sont soit directement diluées dans un tampon deutéré de même force ionique et pH équivalent, soit lyophilisées puis resuspendues dans un tampon deutéré. Cette deuxième méthode offre l'avantage de conserver une concentration protéique élevée et donc de réduire le volume des aliquots à prélever pour réaliser les cinétiques. L'observation au microscope optique des suspensions de microsphères obtenues par chacune des méthodes est présentée en Figure 2-1.

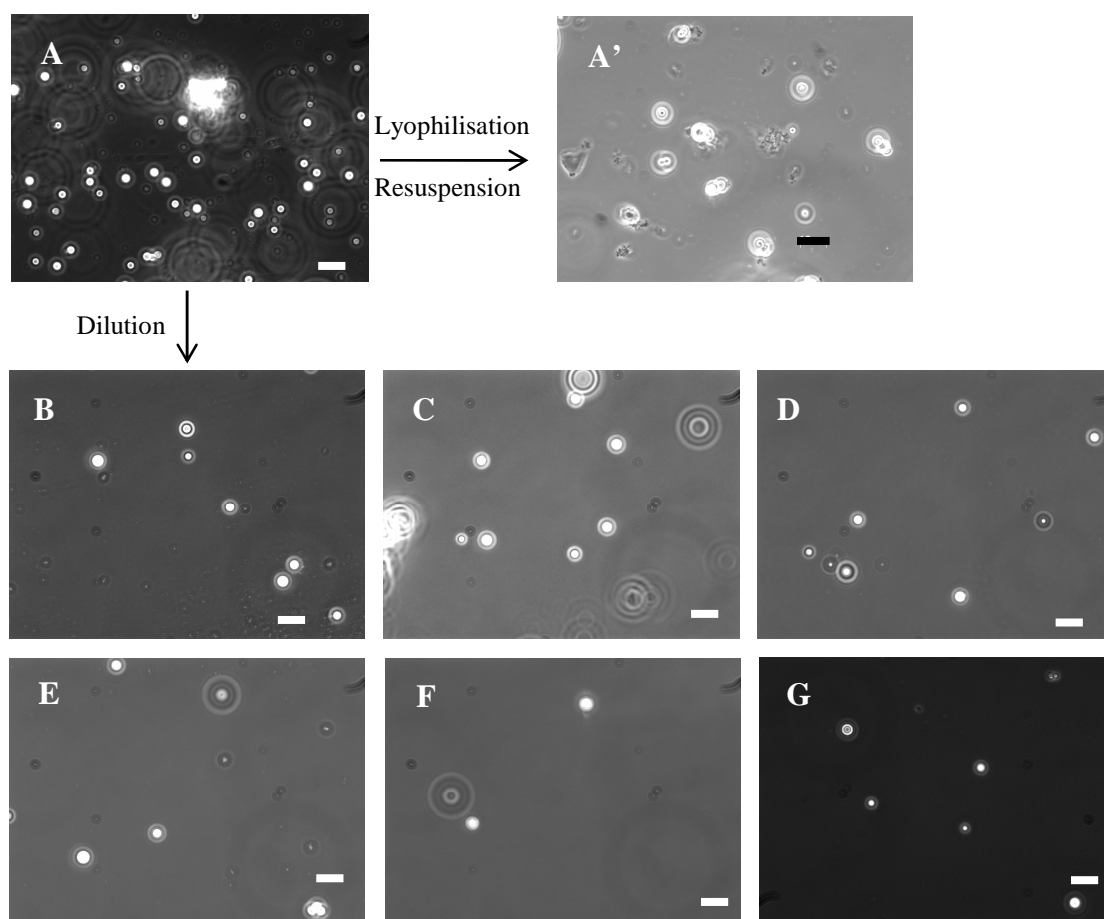


Figure 2-1: Observations au microscope optique de suspensions de microsphères obtenues par incubation à 45°C d'un mélange équimolaire de solutions d'apo α -lactalbumine et de lysozyme à 0.25 mM dans un tampon 30 mM Tris-HCl/H₂O, pH 7.5 (A), après lyophilisation et resuspension dans 30 mM Tris-HCl/D₂O, pD 7.9 (A') et après dilution au dixième dans ce tampon deutéré et incubation pendant 5' (B), 20' (C), 60' (D), 120' (E), 210' (F), 24 h (G). La barre d'échelle correspond à 10 μ m.

Une suspension homogène de microsphères est obtenue après dilution dans un tampon deutéré d'une suspension de microsphères formées dans un tampon aqueux. De plus, l'incubation prolongée dans un tampon contenant 90% v/v D₂O ne semble pas endommager la suspension. Inversement, la resuspension dans un tampon deutéré de microsphères lyophilisées résulte en une suspension de qualité médiocre contenant des microsphères, des agrégats de protéines amorphes et des agrégats mixtes (microsphères en amas et agrégats amorphes). L'étude de la stabilité des microsphères lors du procédé de lyophilisation a été réalisée par l'un des partenaires du projet ANR dans lequel s'inscrit la thèse. Certains résultats ont montré que la présence d'agents protecteurs, tels que le saccharose, sont nécessaires pour conserver les microsphères intactes après lyophilisation et resolubilisation. Cependant les

interactions de ces agents avec les protéines n'ont pas été caractérisées et nous avons opté pour la méthode par dilution.

Pour compléter ces observations microscopiques, nous avons quantifié la proportion de protéines assemblées après dilution au dixième d'une suspension dans un tampon deutéré (Figure 2-2B). Ces mesures ont été réalisées après dilution d'une suspension à 0.5 mM de concentration totale en protéines préparée dans un tampon de faible force ionique (10 mM Tris-HCl). En effet, la proportion de protéines assemblées augmentent avec la concentration en protéine totale (Figure 2-2A) et également lorsque la force ionique diminue (*Nigen et al. 2009*).

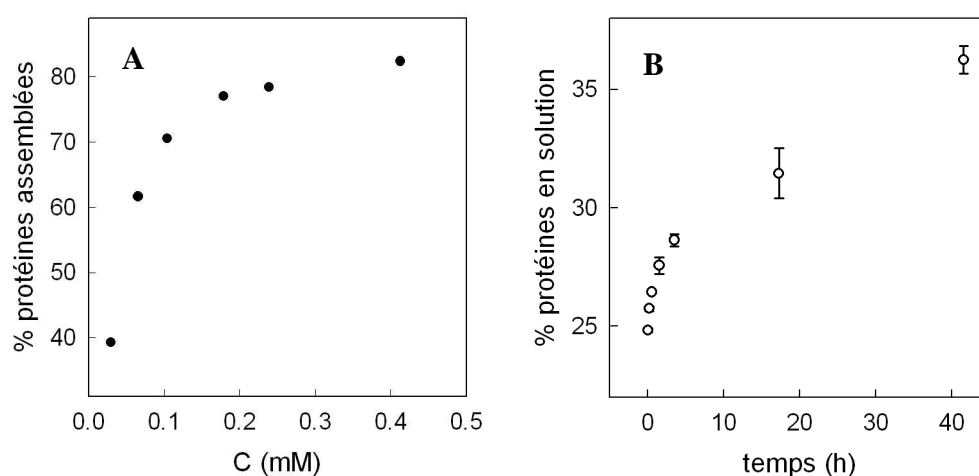


Figure 2-2: **A :** Evolution de la quantité de protéines assemblées en microsphères en fonction de la concentration totale en protéines (mM). Les suspensions ont été obtenues par incubation 30 min à 45°C de mélanges équimolaires de solutions protéiques préparées dans 10 mM Tris, pH 7.5. **B :** Quantification des protéines en solution après dilution au dixième dans 10 mM Tris-HCl/D₂O, pD 7.9 d'une suspension de microsphères à 0.5 mM en protéines totales.

Les résultats obtenus (Figure 2-2B) montrent une augmentation non négligeable de la proportion de protéines libres en solution au cours du temps après dilution. En effet après 24 h d'incubation à température ambiante, la dilution entraîne une libération en solution d'environ 10% des protéines initialement assemblées. L'équilibre entre les forces électrostatiques et hydrophobes au sein de microsphères est probablement perturbé puisque les interactions au sein du solvant et entre le solvant et les protéines sont modifiées lorsque les microsphères sont placées en milieu deutéré. En effet, les liaisons deutérium entre molécules D₂O du solvant sont plus fortes que les liaisons hydrogènes dans l'eau protonée (*Scheiner and Cuma 1996*). Par conséquent, la solvation des résidus apolaires diminue et les interactions hydrophobes sont favorisées en milieu deutéré (*Kresheck et al. 1965; Scheiner and Cuma 1996*).

2.2.2. Arrêt des échanges et déstabilisation des microsphères

Une fois les échanges hydrogène/deutérium initiés, la réalisation des cinétiques nécessite d'arrêter ces échanges à un temps t et de simultanément déstabiliser les microsphères afin de retrouver les protéines monomériques en solution dans leur conformation natives.

Cette étape est réalisée en combinant une diminution de la température, l'ajout de calcium et l'abaissement du pH. En effet la vitesse d'échange hydrogène/deutérium est ralentie par diminution de la température et du pH (*Bai et al. 1993*). L'ajout de calcium permet de retrouver l' α -lactalbumine dans sa conformation native (holo de l' α -lactalbumine). D'autre part, il a été montré que l'ajout d'un excès de calcium ou l'augmentation de la force ionique résultaient en une déstabilisation partielle des microsphères (*Nigen et al. 2009*).

La formation des microsphères étant optimale dans une gamme de pH étroit où les deux protéines portent des charges nettes égales mais de signe opposé, nous avons utilisé l'abaissement du pH afin d'optimiser la déstabilisation des microsphères. Une fois un excès de calcium ajouté, la turbidité d'une suspension de microsphères a été suivie après additions successives de HCl 1 M (Figure 2-3).

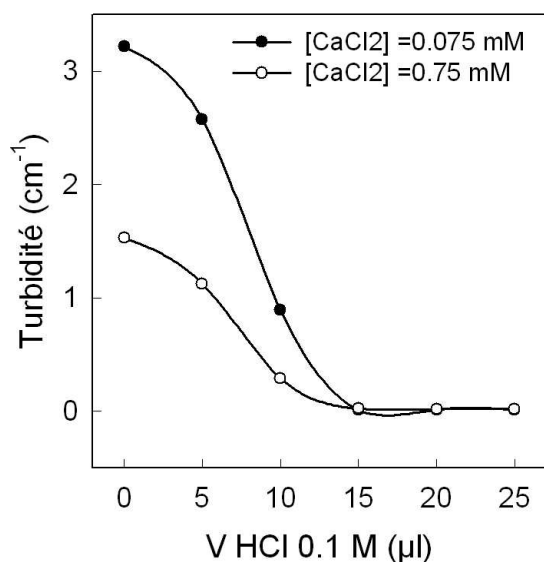


Figure 2-3: Evolution de la turbidité d'une suspension de microsphères obtenue par incubation à 45°C d'un mélange équimolaire d'apo α -lactalbumine et de lysozyme à 0.075 mM dans 10 mM Tris-HCl, après ajout de CaCl_2 (0.075mM, noir et 0.75mM, blanc) et abaissement du pH.

La turbidité est initialement réduite d'un facteur 2 lorsque la concentration en calcium ajoutée augmente d'un facteur 10. L'acidification de la solution s'accompagne d'une baisse de la turbidité signifiant une diminution du nombre et/ou de la taille des microsphères.

A la fin de ces expériences, lorsque la turbidité est nulle, 92 à 95% de protéines totales ont été dosées en solution et le pH mesuré était égal à 2.7. L'ajout d'un excès de calcium et l'abaissement du pH à pH 2.7 permettent donc de totalement déstabiliser les microsphères. L'acidification du milieu à un pH inférieur au pI de l' α -lactalbumine (pI 4.5) déstabilise les microsphères en bannissant les interactions électrostatiques attractives entre les deux protéines qui sont alors chargées positivement.

Cependant à pH 2.7, le site du calcium est totalement protoné et le calcium n'est pas lié à l' α -lactalbumine. La forme holo de l' α -lactalbumine est obtenue à des pH supérieurs ou égaux à pH 4 (*Chenal et al. 2005*).

Puisque la constante de dissociation du Ca^{2+} pour l' α -lactalbumine dépend de la force ionique et du pH de la solution ainsi que de la température (*Griko and Remeta 1999*), nous avons déterminé cette constante à 20° dans un tampon 10 mM Tris-HCl à pH 4 à partir de mesures de fluorescence intrinsèque (Figure 2-4).

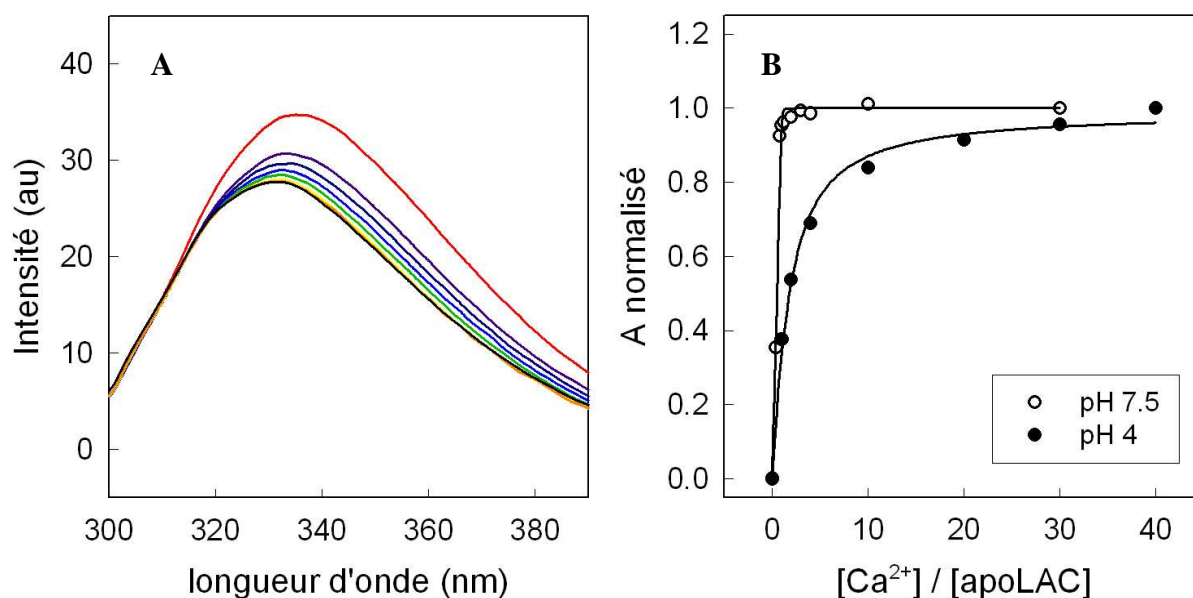


Figure 2-4: **A :** Spectres d'émission de fluorescence intrinsèque de solutions d'holo α -lactalbumine (noir), d'apo α -lactalbumine (rouge) à 25 μM dans 10 mM Tris-HCl/90% v/v D_2O , pH 4 et après ajout de Ca^{2+} pour des rapports molaires $[\text{Ca}^{2+}]/[\text{apoLAC}]$ égaux à 1, 2, 4, 10, 30, 40 (violet à orange). **B :** Evolution du facteur A ($I_{320\text{nm}}/I_{350\text{nm}}$) en fonction de $[\text{Ca}^{2+}]/[\text{apoLAC}]$ à pH 4 (noir) et pH 7.5 (blanc).

L'ajout de calcium à une solution d'apo α -lactalbumine provoque une diminution de la longueur d'onde maximale de fluorescence, caractéristique de la conversion de la forme apo à la forme holo de α -lactalbumine (Figure 2-4A). En effet le spectre obtenu après ajout de 40 équivalents de Ca^{2+} est superposé au spectre de l'holo α -lactalbumine.

La constante de dissociation à pH 4 a été calculée en quantifiant l'évolution du facteur A ($I_{320\text{nm}}/I_{350\text{nm}}$) en fonction du rapport molaire calcium/ α -lactalbumine (Figure 2-4B). Les points expérimentaux ont été modélisés avec une équation du second degré caractéristique d'un équilibre simple : $\text{Ca}^{2+} + \text{apo } \alpha\text{-lactalbumine} \leftrightarrow \text{holo } \alpha\text{-lactalbumine}$. La constante de dissociation du Ca^{2+} pour l' α -lactalbumine à pH 4 est égale à $31.8 \pm 3.6 \mu\text{M}$. La même expérience a été réalisée à pH 7.5 et la constante de dissociation à ce pH est égale à 25 nM, ce qui est en accord avec la valeur rapportée à pH 7.5, i.e. 10^{-8} M (*Bushmarina et al. 2006*). L'augmentation de la constante de dissociation de 3 ordres de grandeur à pH 4 s'explique par la compétition entre les protons et le calcium au niveau du site de fixation de ce métal dans la protéine qui est plus importante à pH acide.

La quantification des protéines en solution a ensuite été réalisée après ajout de calcium et acidification à pH 4. Cependant les résultats ont montré que ces conditions ne permettent pas de retrouver la totalité des protéines en solution et que l'augmentation de la force ionique par ajout de NaCl ne suffisait pas pour déstabiliser totalement les microsphères. Cette étape n'a cependant pas été optimisée au vue des résultats présentés ci-dessous.

2.2.3. Estimation de la vitesse d'échange

L'expérience présentée ici a été réalisée dans le but (i) d'estimer l'échelle de temps sur laquelle planifier les cinétiques d'échanges hydrogène/deutérium et (ii) de comparer les vitesses d'échange des protéines assemblées en microsphères à celles des protéines en solution pure.

La méthode la plus simple à mettre en œuvre pour obtenir ces informations est la spectroscopie infrarouge. En effet, nous avons dans un premier temps réalisé des essais sur les protéines en solution par spectrométrie de masse mais cette méthode de détection aurait nécessité de nombreuses optimisations pour pouvoir suivre les cinétiques des protons porteurs de l'information, c'est-à-dire ceux à échange lent. Les cinétiques d'échange ont donc été estimées par spectroscopie infrarouge en quantifiant la diminution de l'intensité de la bande

amide II caractéristique des groupements amides hydrogénés (1545 cm^{-1}) et l'augmentation de la bande amide II' correspondant aux groupements amides deutérés (1450 cm^{-1}).

Les spectres obtenus au cours du temps pour des solutions pures d'apo α -lactalbumine et de lysozyme et une suspension de microsphères sont présentés en Figure 2-5. Dans ce cas, pour ne pas réduire la sensibilité des mesures, la suspension de microsphères formées dans un tampon aqueux n'a pas été diluée dans un tampon deutéré. Après sédimentation des microsphères, 90% v/v du surnageant a été remplacé par du tampon deutéré. Les mesures ont été réalisées à 20°C dans un tampon 10 mM Tris-HCl contenant 90% v/v D_2O .

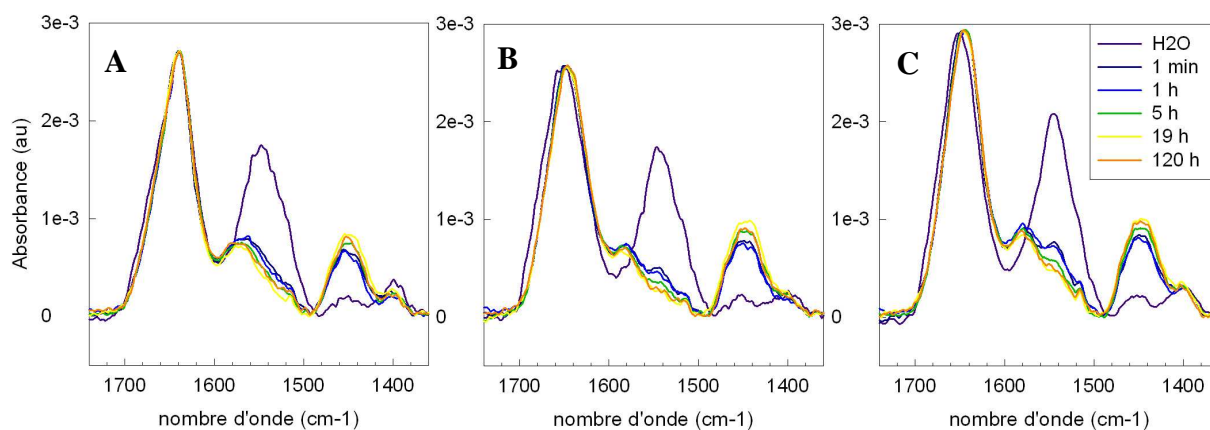


Figure 2-5: Evolution des spectres infrarouge (obtenus en mode ATR) de solutions pures à 0.5 mM d'apo α -lactalbumine (A) et de lysozyme (B) et d'une suspension de microsphères (C) (0.5 mM de protéine totale) dans 10 mM Tris-HCl/ H_2O , pH 7.5 (violet) et après 1 min à 120 h d'incubation à 20°C (de bleu à orange) dans 10 mM Tris-HCl/90% v/v D_2O , pD 7.9.

La comparaison des spectres obtenus dans un tampon aqueux (violet) avec ceux obtenus après incubation dans un tampon deutéré montre une diminution de l'intensité de la bande amide II et une augmentation de l'intensité de la bande amide II'. Ces variations sont également observées dans les cas des microsphères. Les protéines assemblées semblent donc accessibles au solvant.

Les intensités des pics correspondant aux bandes amide II et II' ont été normalisées par rapport aux intensités mesurées en milieu hydrogéné (Figure 2-6).

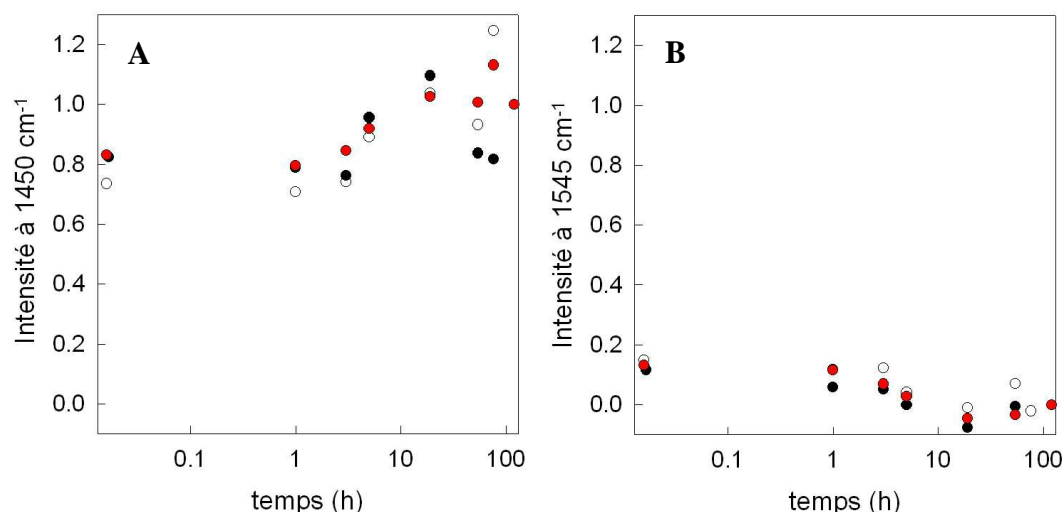


Figure 2-6: Evolution de l'intensité de la bande amide II' (1450 cm^{-1}) (**A**) et de la bande amide II (1545 cm^{-1}) (**B**) en fonction du temps d'incubation dans 10 mM Tris-HCl/90% v/v D_2O , pD 7.9, pour une solution d'apo α -lactalbumine (blanc), de lysozyme (noir) et une suspension de microsphères (rouge). Les valeurs ont été normalisées par rapport aux intensités initiales mesurées dans 10 mM Tris-HCl/ H_2O , pH 7.5.

Les évolutions des intensités observées pour les protéines en solution pure sont comparables à celles mesurées dans le cas des protéines assemblées en microsphères. Après 1 minute d'incubation, environ 80% des protons échangeables (90% des protons labiles dans 90% v/v D_2O) ont été échangés en deutérium. Ce sont les protons amides à échange rapide. Les variations d'intensités observées entre 1 h et 10 h d'incubation correspondent aux cinétiques des protons à échange lent, i.e. ceux impliqués dans la stabilisation des structures secondaires des protéines. Un temps de demi-réaction de 4 h et un facteur de protection d'environ 2500 ont été estimés. La valeur du facteur de protection est en adéquation avec la valeur rapportée pour l'apo α -lactalbumine et légèrement inférieure à celle du lysozyme (*Radford et al. 1992; Wijesinha-Bettoni et al. 2001*). Cette sous-estimation résulte de l'imprécision des mesures. En effet, les cinétiques d'échanges des protons à échange « très lent » ne sont pas observables du fait de l'augmentation du bruit pour des mesures réalisées au-delà de 30 h d'incubation.

Les résultats obtenus semblent donc indiquer que les cinétiques d'échange ne sont pas significativement plus lentes pour les protéines assemblées en microsphères.

Cependant, comme nous l'avons expliqué, la suspension de microsphères n'a pas été diluée dans un tampon deutéré mais le surnageant a été remplacé par du tampon frais. Cette méthode accélère probablement la libération de protéines en solution pour maintenir l'équilibre entre protéines assemblées et protéines en solution. Le signal observé pour la suspension comprend donc le signal des protéines assemblées et celui des protéines libérées en solution.

Malgré ce biais, les expériences de cinétiques peuvent raisonnablement être réalisées sur une durée de 24 h. En effet les échanges sont initiés par dilution et les résultats peuvent être corrigés puisque la proportion de protéines libérées en solution est connue (10% des protéines initialement assemblées).

Cependant, à cette période du projet, la caractérisation par microscopie de l'équilibre thermodynamique entre protéines assemblées et protéines en solution a mis en évidence un échange entre les protéines assemblées et les protéines en solution (*Nigen et al. 2010*). L'ensemble des protéines assemblées est remplacé par des protéines en solution en moins de 75 minutes. Les cinétiques ayant été évaluées sur une journée, ce phénomène peut également expliquer le fait que la vitesse d'échange des protéines en microsphères soit similaire à celles mesurées pour les protéines en solution. Ce phénomène risque également de complexifier l'interprétation des résultats des cinétiques hydrogène/deutérium. La méthode des échanges hydrogène/deutérium n'a donc pas été appliquée à notre système et nous avons choisi de nous focaliser en priorité sur la spectroscopie infrarouge et la réalisation des travaux présentés dans le Chapitre 1.

2.3. Quantification des changements de structure secondaire

L'utilisation de la spectroscopie infrarouge nécessite de travailler dans un tampon deutéré pour s'affranchir du signal des molécules d'eau. En effet, les bandes d'absorption infrarouge caractéristiques des protéines situées entre 1700 et 1400 cm^{-1} sont beaucoup moins intenses que celle des molécules d'eau qui absorbent vers 1450 cm^{-1} .

La formation des microsphères étant très sensible aux conditions physico-chimiques du milieu, leur formation peut être modifiée dans un solvant deutéré. En effet, il a été montré que les interactions hydrophobes sont favorisées dans l'eau lourde par réduction de la solvation des groupes apolaires (*Kresheck et al. 1965; Parker and Clarke 1997*). Un premier travail a donc consisté à évaluer la qualité d'une suspension de microsphères formées dans un tampon deutéré.

2.3.1. Formation de microsphères dans un tampon deutéré

L'observation au microscope d'une suspension de microsphères obtenue par mélange équimolaire de solutions protéiques préparées dans un tampon deutéré à un potentiel deutérium (pD) équivalent à pH 7.5 révèle la présence de microsphères de 2 à $3\text{ }\mu\text{m}$ de diamètre ainsi que des amas de sphères plus ou moins fusionnées (Figure 2-7).

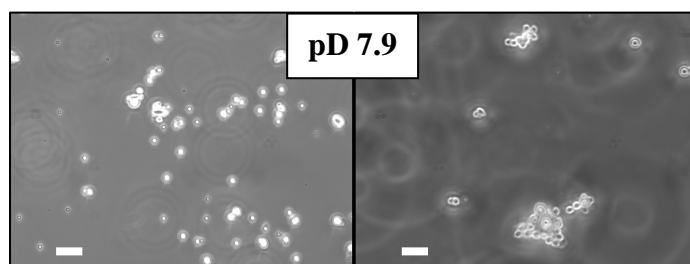


Figure 2-7 : Observations au microscope optique d'une suspension de microsphères formées par incubation à 45°C pendant 30 min d'un mélange équimolaire de solutions à 0.25 mM d'apo α -lactalbumine et de lysozyme dans 30 mM Tris-HCl/D₂O à pD 7.9. La barre d'échelle correspond à $20\text{ }\mu\text{m}$.

Le potentiel deutérium des solutions protéiques a été ajusté à pD 7, 6.5, 6 et 5 afin d'évaluer son influence sur la qualité des suspensions formées et tenter de réduire la formation d'agrégats.

Les observations au microscope optique sont représentées en Figure 2-8. Une diminution de la taille des microsphères a été observée lorsque le pD est abaissé ; le diamètre moyen des microsphères est d'environ 3 μm à pD 7 et de 1 μm à pD 5. L'aspect des agrégats est également modifié ; alors que des amas de sphères sont observés aux faibles pD, des agrégats de sphères plus ou moins fusionnées sont observés lorsque le pD est supérieur à 6.5.

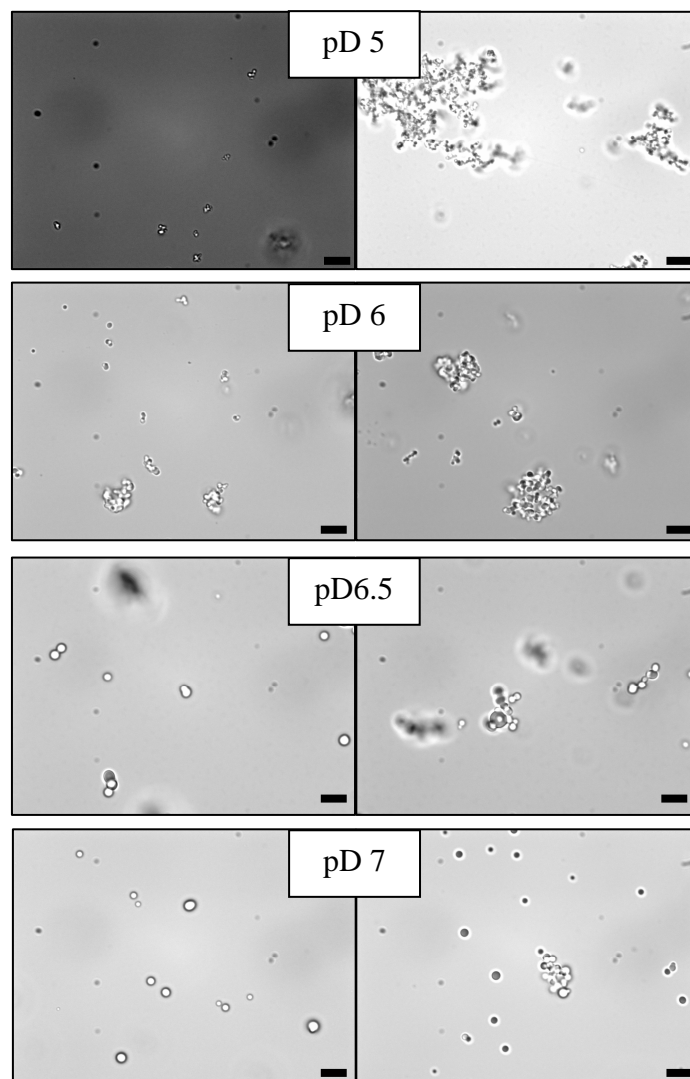


Figure 2-8: Observations au microscope optique de suspensions de microsphères obtenues par incubation 30 min à 45°C d'un mélange équimolaire de solutions à 0.25 mM d'apo α -lactalbumine et de lysozyme dans 30 mM Tris-HCl/D₂O, pD 7, pD 6.5, pD 6 et pD 5. La barre d'échelle correspond à 10 μm .

L'évolution de la taille des microsphères en fonction du potentiel deutérium est identique à celle observée en faisant varier le pH mais l'agrégation des microsphères semble être favorisée dans un tampon deutéré. En effet, les résidus apolaires étant moins solvatés en

milieu deutéré, les microsphères ont probablement tendance à s'agréger au travers d'interactions hydrophobes. La qualité de la suspension obtenue dans un tampon deutéré ne peut être améliorée, ces agrégats sont présents quelque soit le pD.

Un pD d'environ 7.9 a finalement été choisi pour favoriser la formation de microsphères de diamètre supérieur à 1 μm .

Comme expliqué dans le paragraphe III-2.2.1 (Figure 2-2A), nous avons également choisi de travailler dans un tampon de faible force ionique (10 mM Tris) et à 0.5 mM de protéine totale pour augmenter la proportion de protéines assemblées et ainsi s'affranchir au maximum du signal des protéines en solution. Dans ces conditions, 75 à 80% des protéines totales sont assemblées en microsphères.

D'autre part, l'abaissement de la force ionique est susceptible d'affecter la stabilité de l'apo α -lactalbumine (*Griko and Remeta 1999*). Nous avons donc évalué son état conformationnel dans un tampon de faible force ionique en fonction de la température.

2.3.2. Influence de la température et de la force ionique sur les structures secondaire et tertiaire de l'apo α -lactalbumine

L'état conformationnel de l'apo α -lactalbumine a été évalué en réalisant des mesures de dichroïsme circulaire dans l'UV lointain et l'UV proche pour caractériser respectivement ses structures secondaire et tertiaire. Cette étude n'a pas été réalisée pour le lysozyme car celui-ci est stable dans les conditions étudiées.

Les spectres obtenus dans 10 mM Tris à 20°C et 45°C sont représentés en Figure 2-9. Les spectres obtenus pour l'apo α -lactalbumine à pH 7.5 ont été comparés à ceux de l'holo α -lactalbumine à pH 7.5 et du « molten globule » à pH 2. En effet ces deux protéines sont considérées comme des références puisque leur état conformationnel est connu.

A 20 et 45°C, les spectres de la forme holo de l' α -lactalbumine sont caractérisés par un minimum d'ellipticité à 208 nm dans l'UV lointain et par la présence d'un signal négatif à 270 nm dans l'UV proche. Ces deux signaux sont respectivement représentatifs d'une protéine contenant majoritairement des hélices α et présentant une structure tertiaire stable; l'holo α -lactalbumine est dans sa conformation native.

Inversement, quelque soit la température, les spectres de l'apo α -lactalbumine à pH 2 sont caractérisés par une diminution des ellipticités à 208 nm et l'absence de signal dans l'UV proche. En effet l'apo α -lactalbumine à pH 2 est dans son état molten globule qui est caractérisé par la présence de structure secondaire et l'absence de structure tertiaire stable (Ku wajima 1996; Bushmarina et al. 2006).

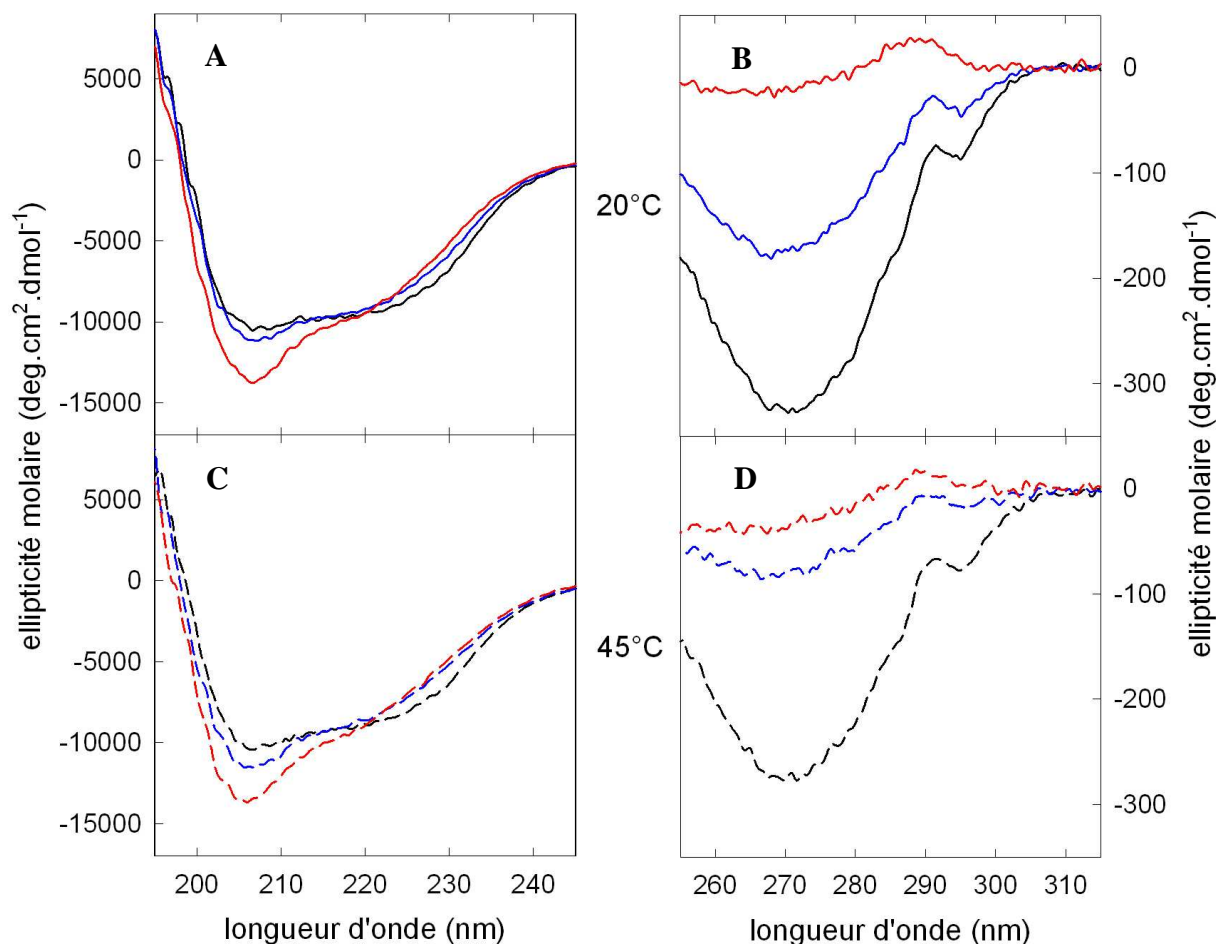


Figure 2-9: Spectres de dichroïsmes circulaires dans l'UV lointain (A et C) et dans l'UV proche (B et D) pour des solutions à 14 μ M préparées dans 10 mM Tris-HCl : holo α -lactalbumine à pH 7.5 (noir), apo α -lactalbumine à pH 7.5 (bleu) et apo α -lactalbumine à pH 2 (rouge) à 20°C (trait plein) et à 45°C (trait discontinu).

A 20°C, l'apo α -lactalbumine à pH 7.5 présente une structure secondaire proche de l'holo α -lactalbumine (Figure 2-9A) et une ellipticité dans l'UV proche deux fois moins importante (Figure 2-9B). Cette différence indique que la diminution de la force ionique induit des modifications de structure tertiaire de l'apo α -lactalbumine. En effet, lorsque l'apo

α -lactalbumine est dans sa conformation native, le signal dans l'UV proche est seulement 1.2 fois inférieur à la forme holo, d'après les résultats obtenus à 20°C dans un tampon de force ionique dix fois plus élevée (100 mM Tris-HCl) (*Bushmarina et al. 2006*). Il a également été montré que les signaux dans l'UV proche de l'apo et l'holo α -lactalbumine sont semblables à 10°C dans un tampon à 39 mM de force ionique (*Nigen 2009*). Enfin, les expériences RMN présentées précédemment à 20°C et 39 mM de force ionique ont montré que l'apo α -lactalbumine possède une structure tertiaire stable à cette force ionique intermédiaire (spectre résolu caractéristique de sa conformation native Figure 1-5B).

La protéine n'est donc pas dans sa conformation native à 20°C dans un tampon de faible force ionique (10 mM Tris-HCl) mais dans un état partiellement déplié. Ces résultats sont en adéquation avec ceux précédemment obtenus (*Griko and Remeta 1999*): une diminution de la force ionique augmente la flexibilité de la structure tertiaire de l'apo α -lactalbumine. Cet état intermédiaire n'est probablement pas réellement peuplé mais correspond à un équilibre entre la conformation native et l'état molten globule de l'apo α -lactalbumine.

A 45°C, ces modifications sont plus importantes car la température est supérieure à la température de dénaturation de l'apo α -lactalbumine. En effet, une augmentation de la température de 20 à 45°C diminue son ellipticité à 208 nm et réduit son signal dans l'UV proche d'un facteur 4 par rapport à la forme holo (Figure 2-9D). A 45°C, les structures secondaire et tertiaire de l'apo α -lactalbumine à pH 7.5 sont alors comparables à celles du « molten globule » stabilisé à pH acide. Des résultats similaires ont été obtenus dans un tampon à 39 mM de force ionique (*Nigen 2009*).

En conclusion, l'abaissement de la force ionique réduit la stabilité de l'apo α -lactalbumine puisque celle-ci est dans un état partiellement déplié à 20°C. D'autre part elle adopte sa conformation molten globule lorsque la température est supérieure à sa température de dénaturation.

Lorsque l'apo α -lactalbumine est dans sa conformation native, son assemblage avec le lysozyme résulte en des agrégats amorphes à 20°C alors que des microsphères sont obtenues à 45°C lorsqu'elle est dans son état molten globule (*Nigen et al. 2007*). A faible force ionique, l'apo α -lactalbumine à 20°C étant dans un état partiellement déplié qui correspond à un équilibre entre protéine native et molten globule, nous avons testé sa capacité à former des

objets ordonnés avec le lysozyme. Les observations par microscopie optique des suspensions obtenues par incubation prolongée à température ambiante sont présentées en Figure 2-10.

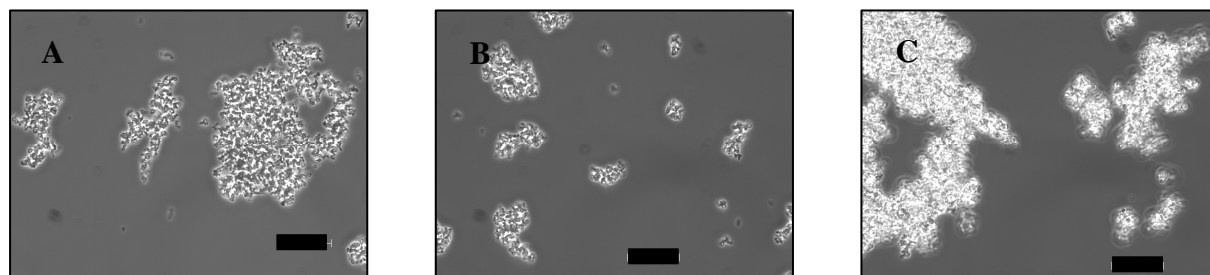


Figure 2-10: Observations au microscope optique d'une suspension formée par incubation à 20°C pendant 20' (A), 3h (B) et 24h (C) d'un mélange équimolaire d'apo α -lactalbumine et de lysozyme à 0.5 mM dans 10 mM Tris-HCl pH 7.5. La barre d'échelle correspond à 20 μ m.

Quelque soit le temps d'incubation à température ambiante, seuls des agrégats amorphes sont formés. L'état partiellement déplié de l'apo α -lactalbumine n'est donc pas un facteur suffisant pour permettre son assemblage avec le lysozyme en objets ordonnés sphériques.

Cependant est-ce la présence d'apo α -lactalbumine sous sa forme native qui empêche l'organisation des objets supramoléculaires en microsphères ou est-ce un effet propre de la température ?

Puisque l'augmentation de la température implique également la conversion totale de l'apo α -lactalbumine dans son état « molten globule », nous ne pouvons pas discriminer entre ces deux facteurs. Cependant, ces résultats montrent clairement que la stabilisation de l' α -lactalbumine dans sa conformation « molten globule » et l'augmentation de la température sont essentielles à la formation d'objets supramoléculaires ordonnés.

2.3.3. Structure secondaire des protéines assemblées en microsphères

Les éventuelles modifications de structure secondaire des protéines assemblées en microsphères ont été étudiées par spectroscopie infrarouge. Les changements structuraux ont été quantifiés par comparaison de la structure secondaire des protéines assemblées avec celle des protéines individuelles.

La Figure 2-11A représente les spectres infrarouges obtenus à 20°C pour les protéines à 0.5 mM en solution pure dans 10 mM Tris-HCl/D₂O à pD 7.9. La Figure 2-11B compare le spectre construit (spectre du lysozyme + 0.94 spectre apo α -lactalbumine, afin de s'affranchir des différences d'absorbance à 1650 cm⁻¹, dues à des concentrations légèrement différentes de 0.5 mM) au spectre obtenu à 20°C pour une suspension de microsphères, préalablement obtenue par incubation à 45°C d'un mélange équimolaire d'apo α -lactalbumine et de lysozyme à 0.5 mM.

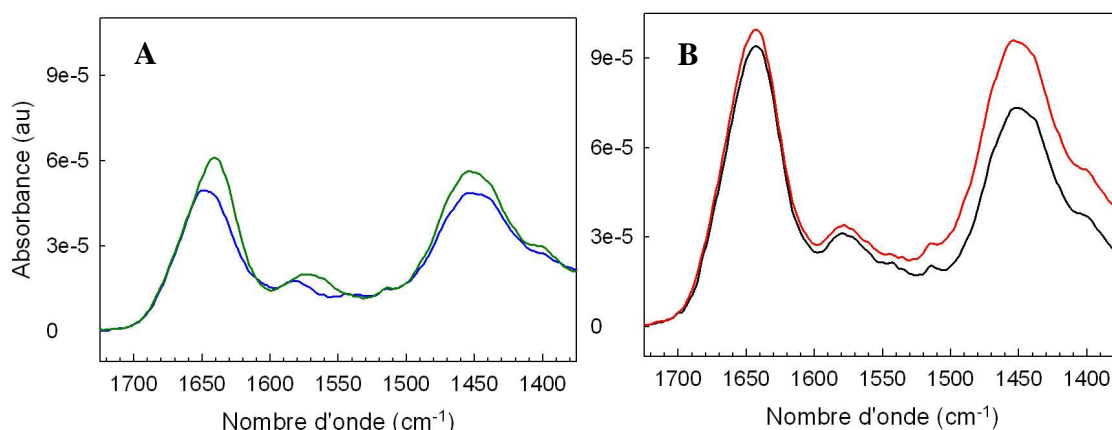


Figure 2-11: Spectres infrarouge (mode ATR) obtenus à 20°C pour des solutions pures à 0.5 mM dans 10 mM Tris-HCl/D₂O pD 7.9 d'apo α -lactalbumine (vert) et de lysozyme (bleu) (A) et d'une suspension de sphères à 0.5 mM de protéine totale (noir) (B). Le spectre construit (α -lactalbumine+lysozyme) est tracé en rouge.

Le maximum d'absorption de la bande amide I est situé à 1641 cm⁻¹ pour l'apo α -lactalbumine et à 1650 cm⁻¹ pour le lysozyme. La bande située à 1450 cm⁻¹ est la bande amide II' correspondant aux vibrations des groupements amides deutérés. La bande vers 1580 cm⁻¹ est caractéristique des groupements carbonyles des chaînes latérales des résidus aspartates et glutamates. Les bandes amides I du spectre infrarouge de la suspension de microsphères et du spectre construit présentent un maximum d'absorption à 1643 cm⁻¹, illustrant la contribution de chacune des protéines sur le signal.

Le spectre de différence (Figure 2-12B) permet d'accentuer les éventuelles différences entre les spectres de la suspension de microsphères et le spectre construit (Figure 2-12A). Les composantes contenues dans les bandes amides I de ces deux spectres ont été séparées en calculant leur dérivée seconde et leur déconvoluée, représentées en Figures 2-12C et D.

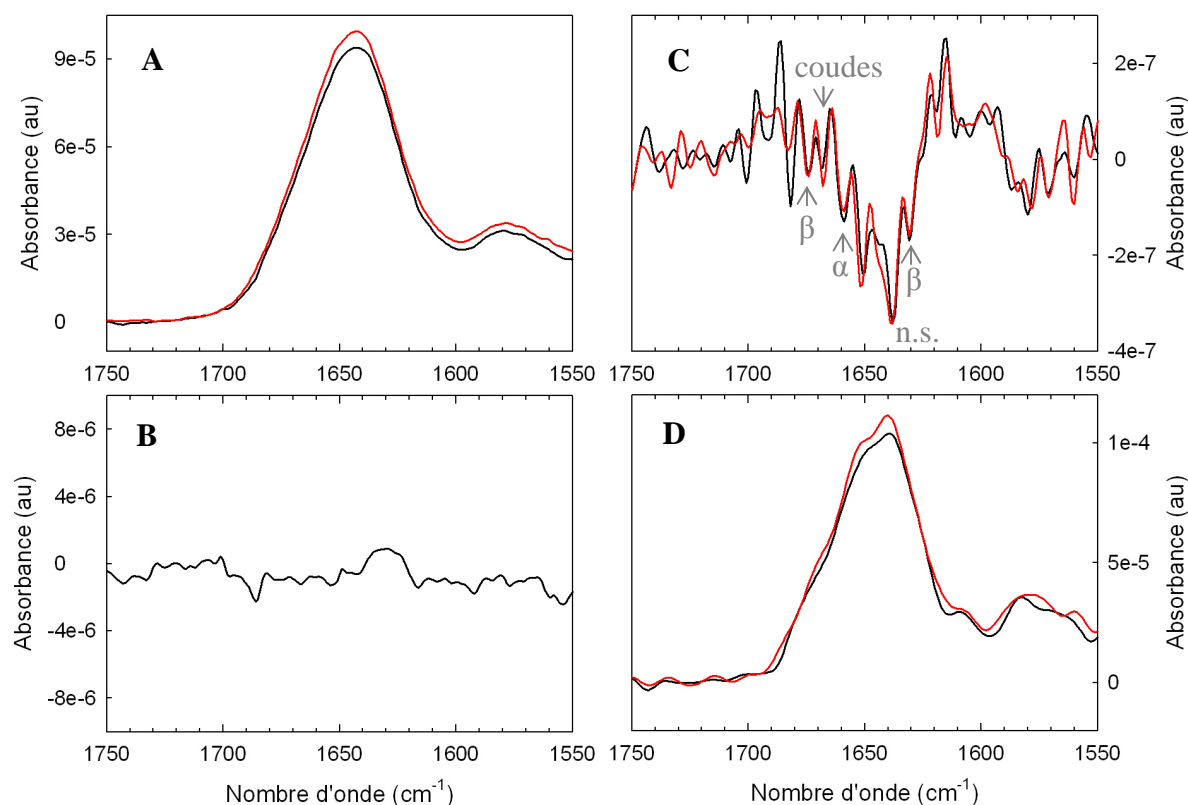


Figure 2-12: **A :** Spectres infrarouge (mode ATR) de la suspension de sphères (noir) et spectre construit (0.94 α -lactalbumine+lysozyme) (rouge). **B :** Spectre de différence (spectre suspension de sphères – 0.98 spectre construit). **C :** Dérivées secondes et **D :** déconvoluées des spectres.

La comparaison des dérivées de spectres (Figure 2-12C) ne montre pas de différence significative. En effet, seule la position des pics négatifs renseigne sur la présence ou l'absence de structures secondaires, indépendamment de leur intensité. Le pic à 1640 cm⁻¹ correspond aux régions non structurées (n.s), celui à 1660 cm⁻¹ aux hélices α , ceux à 1630 et 1680 cm⁻¹ aux brins β , respectivement en conformation parallèle et antiparallèle et la bande comprise entre 1680 et 1670 cm⁻¹ correspond aux coudes.

La comparaison des spectres déconvolués (Figure 2-12D) ne montre pas de différence significative. Seule une légère augmentation de la bande située vers 1630 cm⁻¹ est observée sur le spectre de différence (Figure 2-12B). Celle-ci pourrait être caractéristique de feuillets β non natifs (*Troullier et al. 2000*) mais du fait de faible rapport signal/bruit, nous ne pouvons pas affirmer la formation de feuillets β intermoléculaires. L'apparition de feuillets β non natifs n'est cependant pas exclue.

Alors que la formation d'objets supramoléculaires résultant de l'assemblage d'une protéine partiellement dépliée implique généralement des modifications de structures secondaires, telles que la formation de feuillets β intermoléculaires, la conversion de structures secondaires natives en structures secondaires non natives n'a pas été observée dans le cas de l'assemblage de l'apo α -lactalbumine et du lysozyme en microsphères. La formation de ces objets ne semble donc pas impliquer de changements drastiques de structure secondaire des protéines.

2.4. Conclusions du Chapitre 2 et perspectives

Les travaux présentés dans ce chapitre visaient à caractériser les interactions entre protéines assemblées au sein des microsphères.

La méthode des cinétiques d'échange hydrogène/deutérium n'a pas été appliquée à notre système car l'équilibre thermodynamique entre les protéines en solution et les protéines assemblées complexifient considérablement le système d'étude.

Cependant, les expériences réalisées dans le but d'utiliser cette méthode nous ont apporté des informations intéressantes quant à la stabilité du système. En effet nous avons montré que la dilution des microsphères dans un tampon deutéré résultait en une libération en solution de protéines assemblées. L'agrégation des microsphères est également favorisée lorsque celles-ci sont obtenues dans un tampon deutéré. La balance de force régissant leur stabilité semble donc perturbée en milieu deutéré où les interactions hydrophobes sont favorisées. L'implication de forces hydrophobes a également été mise en évidence puisque la déstabilisation des microsphères n'est pas complète après augmentation de la force ionique du milieu. Seul l'abaissement du pH en dessous de pH 3 permet de recouvrir l'ensemble des protéines en solution ; dans ces conditions les répulsions électrostatiques entre les protéines chargées positivement sont donc probablement prépondérantes sur les interactions hydrophobes.

Nous avons mis en évidence l'effet de la diminution de la force ionique sur l'état conformationnel de l'apo α -lactalbumine. En effet, la transition vers son état molten globule est observée à température ambiante lorsque la force ionique du solvant est inférieure à 8 mM. Nous avons également montré que lorsque le « molten globule » n'est que partiellement

peuplé, seuls des objets supramoléculaires non ordonnés sont obtenus. Nous avons ainsi mis en évidence que la stabilisation de l'état « molten globule » et l'augmentation de la température sont indispensables à la formation des microsphères.

Alors que des modifications de structure secondaire étaient attendues puisque l'un des partenaires impliqués dans la formation des microsphères est dans un état partiellement déplié, les protéines assemblées en microsphère ne présentent pas de modification drastique de structure secondaire. La formation de feuillets β non natifs n'est cependant pas exclue. Pour mettre en évidence la formation de feuillets β intermoléculaires, il serait intéressant de mesurer la fluorescence de la thioflavine en présence de microsphères ou d'observer une suspension sous lumière polarisée en présence de rouge congo. En effet la thioflavine est une sonde fluorescente connue pour se fixer spécifiquement aux feuillets β intermoléculaires (*Krebs et al. 2005*) et les fibres amyloïdes présente une biréfringence verte du rouge congo (*Nilsson 2004; Chiti and Dobson 2006*).

D'autre part, l'installation infrarouge utilisée ne permet pas de travailler à 45°C. Si des changements sont réversibles par abaissement de la température ils ne peuvent être détectés lorsque les microsphères sont étudiées à 20°C. Des essais ont été réalisés à l'aide d'un spectromètre infrarouge opérant en mode transmission et équipé d'un porte échantillon thermostaté (voir paragraphe II-2.7.3). Cependant les résultats obtenus ne nous ont pas convaincus de la faisabilité de cette expérience car la sensibilité des mesures est limitée dans nos conditions d'étude (0.5 mM de concentration totale en protéines). La concentration optimale utilisée en infrarouge est 1.5 mM mais à cette concentration, la suspension de microsphères est de qualité médiocre car elle contient de nombreux agrégats de microsphères. C'est pourquoi l'ensemble des mesures a été réalisé en mode réflexion offrant une plus grande sensibilité. Cependant, il serait intéressant de reproduire ces mesures en utilisant une installation en mode réflexion permettant un contrôle en température ou en étudiant en mode transmission une suspension de microsphères préparées à concentration élevée en protéine, malgré la présence d'agrégats.

Afin d'obtenir des informations quant à l'organisation des protéines au sein des microsphères, nous pouvons envisager la cristallisation des microsphères. Leur formation et leur stabilité étant gouvernée par une balance fine entre forces de faible énergie, l'établissement des conditions de cristallisation risque de demander un travail considérable. Une approche alternative envisageable est l'utilisation des méthodes de variation de contraste

fondées sur la diffusion des neutrons qui permettent de travailler en milieu liquide. Cette approche nécessite cependant de produire des protéines recombinantes uniformément marquée par du deutérium. En effet, les propriétés neutroniques de l'hydrogène et du deutérium sont très différentes et permettent de faire « ressortir » une des deux protéines assemblées et ainsi d'étudier les conformations des celles-ci au sein des microsphères (**Bonnet et al. 2008**). Cette technique permet également d'identifier les mouvements des protéines dans une gamme temporelle de 10^{-12} s à 10^{-9} s. Ainsi nous pourrions évaluer la dynamique des protéines au sein des microsphères. Il est tout de même important de préciser que cette approche est très onéreuse car la production de protéines enrichies en deutérium nécessite la mise en culture de bactérie dans un milieu deutéré.

3. Cinétiques et mécanismes d'assemblage

Les travaux réalisés précédemment au laboratoire ont mis en évidence l'effet de la température sur la morphologie des objets supramoléculaires formés par assemblage de l'apo α -lactalbumine et du lysozyme (*Nigen et al. 2007*), i.e. des agrégats amorphes à 25°C et des microsphères à 45°C. Afin d'expliquer ces observations, nous avons étudié le mécanisme d'assemblage de ces deux protéines entre l'échelle des dimères caractérisés dans le chapitre 1 et les objets supramoléculaires observés par des techniques microscopiques. Le mécanisme d'assemblage a été établi en caractérisant les cinétiques d'assemblage par des expériences de diffusion de lumière.

Les travaux présentés dans ce chapitre visent à répondre aux questions suivantes :

- Quelles sont les étapes intermédiaires du mécanisme d'assemblage, comprises entre la formation des hétérodimères et les objets micrométriques ?
- A quelle(s) étape(s) intervient la température pour la formation d'agrégats amorphes ou de microsphères à l'échelle microscopique ?

Après avoir rappelé les informations apportées par la diffusion de la lumière, nous présenterons les travaux visant à établir les conditions physicochimiques permettant de ralentir les cinétiques d'assemblage. Pour ce faire, des mesures multi-angles ont été réalisées en variant les paramètres physico-chimiques influençant la réaction d'assemblage : la température d'incubation, la concentration totale en protéines et la force ionique du milieu.

A partir des résultats obtenus, la réaction de formation des particules a ensuite été suivie par des mesures en temps réel à un seul angle, afin de caractériser l'évolution de la vitesse de croissance des particules et de leur rayon hydrodynamique au cours du temps selon les conditions physico-chimiques du milieu. Ces travaux seront présentés sous la forme d'un projet de publication. Ils ont été réalisés en collaboration avec Taco Nicolai du laboratoire des polymères, colloïdes et interfaces de l'Université du Maine, Le Mans.

3.1. Caractérisation des assemblages protéiques par diffusion de lumière

Lorsque de la lumière passe au travers d'une solution colloïdale, une partie de cette lumière est diffusée. Les mesures de diffusion statique de la lumière analysent l'intensité de la lumière diffusée alors que les mesures de diffusion dynamique de la lumière analysent les fluctuations temporelles de celle-ci dues au mouvement brownien des particules. La diffusion de lumière permet d'obtenir des informations morphologiques, telles que la masse molaire apparente, le rayon de giration (R_g), la structure interne des particules ainsi que leur rayon hydrodynamique (R_h) (*Murphy 1997*). C'est une technique largement utilisée pour étudier la composition et la stabilité de suspensions colloïdales. A titre d'exemple, la diffusion de lumière permet de caractériser les systèmes colloïdaux utilisés en pharmacologie pour le transport et la libération contrôlés de molécules bioactives (*Villari and Micali 2008*) ainsi que les mécanismes de polymérisation induisant une séparation de phase (*Croguennoc et al. 2001; Maugey et al. 2001; Baussay et al. 2006*).

La diffusion statique de la lumière mesure l'intensité de lumière diffusée, $I = K \cdot C \cdot M_w \cdot P(q) \cdot S(q)$, qui est proportionnelle à la concentration en protéines (C) et à la masse molaire (M_w) des objets formés et dépend également du facteur de structure de la suspension ($S(q)$) et du facteur de forme ($P(q)$) des particules qui renseigne sur la taille et la structure interne des particules. K est une constante optique caractéristique du système d'étude.

L'augmentation de l'intensité de lumière illustre une augmentation de la quantité d'interface et donc la formation de particules. En milieu dilué, le facteur de structure de la suspension est égal à 1 car il n'y a pas d'interférences dues aux interactions entre particules. L'intensité mesurée reflète donc l'intensité diffusée par chaque particule indépendamment. Dans ces conditions, le facteur de forme est obtenu par des mesures multi-angles de la lumière diffusée. L'intensité de lumière diffusée (I/KC) est représentée en fonction du vecteur d'onde ($q = 4\pi \cdot n_s \cdot \sin(\theta/2) / \lambda$, avec n_s l'indice de réfraction du milieu, θ l'angle d'observation et λ la longueur d'onde de la source lumineuse). L'inverse du vecteur d'onde renseigne sur l'échelle d'observation ; les mesures multi-angles de la lumière diffusée permettent d'observer des particules de taille (rayon de giration) comprise entre 40 et 400 nm. Différents domaines sont définis sur les dépendances angulaires de l'intensité diffusée (explications détaillées dans le paragraphe II-2.10.1). Aux petits angles, on a $q \cdot R_g \ll 1$ et le facteur de forme est égal à 1.

L'extrapolation de l'intensité diffusée lorsque $q \rightarrow 0$ permet alors d'accéder à la masse molaire apparente (M_w) des particules. Aux grands angles, on a $q.R_g \gg 1$ et l'intensité de lumière renseigne sur la proportion de protéines agrégées ainsi que sur la structure interne des particules. Le facteur de forme des particules est accessible lorsque la dépendance angulaire est linéaire.

La diffusion dynamique de la lumière permet d'obtenir une distribution en taille des solutions colloïdales contenant des particules de 1 nm à 1 μ m. L'étude des fluctuations de l'intensité diffusée à un angle donné permet d'accéder au rayon hydrodynamique (R_h) des particules. Celui-ci est déterminé par l'analyse de la fonction caractérisant la relaxation de l'intensité de la lumière diffusée (*Nobmann et al. 2007*).

La diffusion de lumière a été choisie pour étudier la réaction d'assemblage de l'apo α -lactalbumine et du lysozyme car cette technique est particulièrement adéquate pour suivre la formation de particules sub-micrométriques. D'une part, c'est une technique non invasive qui permet d'étudier les particules directement en solution. Ceci est un avantage certain comparé à la résonance plasmonique de surface qui nécessite d'immobiliser les particules sur une surface adéquate ou encore à la microscopie électronique à balayage qui caractérise les particules après évaporation du solvant. En effet ces traitements peuvent altérer les particules. D'autre part, la combinaison des mesures de diffusion statique et dynamique de la lumière permet d'étudier des particules de taille comprise entre 1 nm à 1 μ m. Nous pouvons ainsi observer les particules de taille intermédiaire entre les protéines monomériques en solution et les objets supramoléculaires de plusieurs microns.

3.2. Intensité de la lumière diffusée en fonction des conditions physico-chimiques

La taille des particules formées et la proportion de protéines agrégées par assemblage de l'apo α -lactalbumine et du lysozyme dépendent des conditions physico-chimiques du milieu. Cette partie présente les résultats obtenus par des mesures multi-angles en faisant varier la température d'incubation, la concentration totale en protéines et la force ionique du milieu. L'ensemble des mesures a été réalisé après 15 minutes d'incubation de mélanges équimolaires de solutions protéiques préparées dans des tampons à pH 7.5, c'est-à-dire au pH optimal pour la compensation des charges (la charge nette de l' α -lactalbumine est -7 et la charge nette du lysozyme est +7).

Les résultats sont présentés sous la forme de dépendances angulaires, représentant I/KC en fonction du vecteur d'onde q . Les informations obtenues sont essentiellement qualitatives car la masse molaire apparente des particules formées n'a pu être calculée. En effet la proportion de protéines assemblées dans les multiples conditions utilisées n'a pas été déterminée.

3.2.1. Dépendances angulaires en fonction de la température d'incubation

L'évolution de l'intensité du signal en fonction de la température d'incubation a été mesurée en incubant des mélanges équimolaires à 0.1 et 0.2 mM de protéine totale et 39 mM de force ionique pendant 15 min à des températures comprises entre 25 et 45°C. Les mesures ont été réalisées après dilution des suspensions à 0.01 mM de protéine totale pour éviter les phénomènes d'interactions entre particules ($S(q)=1$) et stopper la croissance des particules. La Figure 3-1 présente les dépendances angulaires ainsi obtenues.

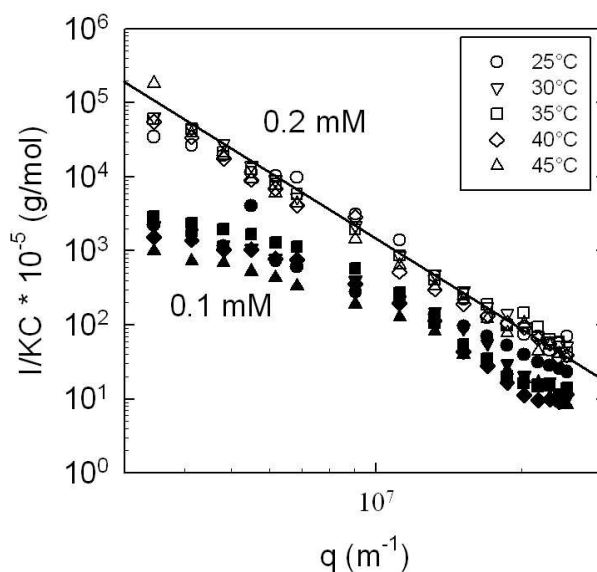


Figure 3-1: Dépendances angulaires en fonction de la température d'incubation. Les suspensions ont été obtenues après 15 min d'incubation de mélanges équimolaires à 0.2 mM (symboles blancs) et 0.1 mM (symboles noirs) de concentration totale en protéines dans un tampon de force ionique égale à 39 mM. Les mesures ont été réalisées à 20°C après dilution des mélanges à 0.01 mM. La droite représentée a une pente égale à -4.

Dans la gamme de température étudiée, celle-ci ne semble pas avoir d'effet sur la formation des objets observés par diffusion de lumière. En effet, pour une concentration donnée, les dépendances angulaires obtenues aux différentes températures sont comparables.

La dépendance angulaire est linéaire et proportionnelle à q^{-4} après 15 min d'incubation à 0.2 mM de concentration totale en protéines. Cette dépendance est caractéristique d'une suspension monodisperse de particules présentant une structure interne homogène (densité homogène) et une surface lisse (*Croguennoc et al. 2001*). Cette dépendance est observée à tous les angles, signifiant que la structure interne des particules est homogène jusqu'à une taille inférieure limite de 40 nm (q^{-1} correspondant au plus grand angle d'observation).

Ces résultats nous indiquent donc que les suspensions obtenues à 0.2 mM de protéine totale et 39 mM de force ionique sont composées, après 15 minutes d'incubation, de particules sphériques monodisperses présentant une structure interne homogène quelque soit la température.

L'intensité diffusée par les mélanges à 0.1 mM de concentration totale en protéines est plus faible et les dépendances angulaires obtenues ne sont pas linéaires. Nous nous sommes donc ensuite intéressés à l'influence de la concentration en protéine totale sur la qualité de la suspension obtenue après 15 minutes d'incubation.

3.2.2. Dépendances angulaires en fonction de la concentration

Des mélanges équimolaires de concentrations totales en protéine comprises entre 0.05 et 0.2 mM dans un tampon de force ionique égale à 39 mM ont été incubés 15 min à 45°C et 25°C. La Figure 3-2 montre les dépendances angulaires obtenues après dilution des échantillons à 0.01 mM.

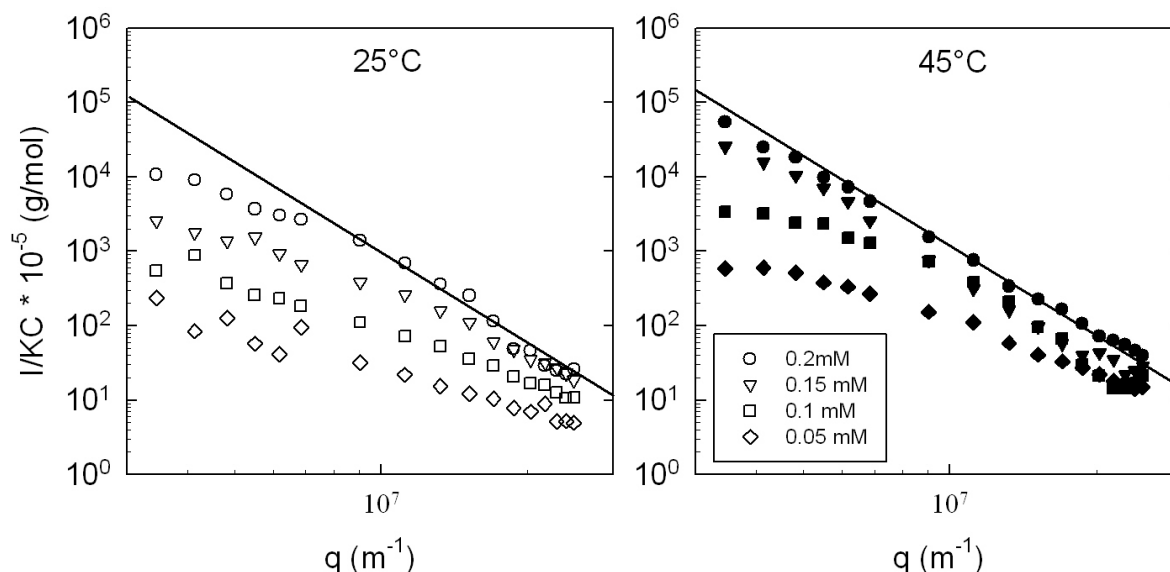


Figure 3-2 : Dépendances angulaires en fonction de la concentration totale en protéines (0.2, 0.15, 0.1, 0.05 mM) obtenues après 15 minutes d’incubation de mélanges équimolaires à 25°C (symboles blancs) et 45°C (symboles noirs) dans un tampon à 39 mM de force ionique. Les mesures ont été réalisées à 20°C après dilution des mélanges à 0.01 mM. Les droites représentées ont une pente égale à -4.

L’augmentation de l’intensité diffusée pour des concentrations croissantes en protéines traduit l’augmentation de la quantité d’interface due à la formation de particules. L’intensité de lumière diffusée augmente à tous les angles quelque soit la température. La proportion de protéines assemblées et la taille des particules formées augmentent donc pour des concentrations croissantes en protéines. Ces résultats sont en adéquation avec ceux publiés précédemment (*Nigen et al. 2007*).

La diffusion de lumière apporte cependant des informations supplémentaires quand à la qualité de la suspension formée. En effet, la dépendance angulaire linéaire proportionnelle à q^{-4} , caractéristique d’une suspension de particules sphériques monodisperses présentant une structure interne homogène, n’est observée que pour des concentrations supérieures ou égales

à 0.2 mM à 25°C et 45°C. En effet, compte tenu des résultats présentés précédemment en fonction de la température, les différences observées ici pour une même concentration aux deux températures ne sont pas significatives.

Des mesures de diffusion dynamique de la lumière ont permis de quantifier l'évolution du rayon hydrodynamique (R_h) des objets formés en fonction de la concentration (Figure 3-3). La limite haute de détection se situe vers 1 μm . Les valeurs représentées pour une concentration donnée sont une moyenne des valeurs de R_h calculées à chaque angle. La précision des valeurs obtenues par cette méthode est relativement faible (± 100 nm). Néanmoins, les résultats illustrent l'augmentation du rayon hydrodynamique des particules avec une concentration croissante en protéine totale. Après 15 minutes d'incubation, des particules d'environ 200 nm sont obtenues à 0.05 mM et leur rayon est supérieur à 800 nm lorsque la concentration est de 0.2 mM. Cette évolution est comparable à 25 et 45 °C.

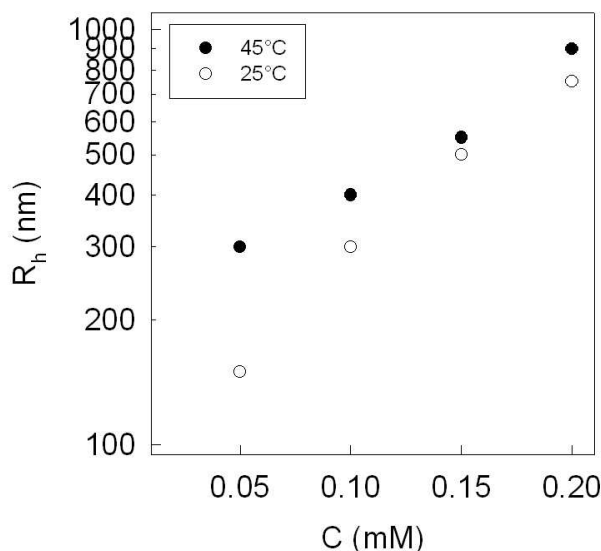


Figure 3-3 : Evolution du rayon hydrodynamique (R_h) des particules formées en fonction de la concentration totale en protéines (C) pour des mélanges équimolaires incubés 15 minutes à 25°C (blanc) et 45°C (noir).

Ces résultats semblent donc indiquer que des états intermédiaires du mécanisme peuvent être identifiés en diminuant la concentration totale en protéines. En effet une concentration totale en protéines inférieure à 0.2 mM permet de diminuer la taille des particules formées et de ralentir la formation d'une suspension monodisperse de particules homogènes.

3.2.3. Stabilité des échantillons après dilution

Les mesures présentées précédemment ont été réalisées après dilution des suspensions en supposant que la dilution permette de stopper l'évolution du système. Nous avons vérifié la validité de cette hypothèse en réalisant des mesures après incubation prolongée à température ambiante des suspensions diluées. La Figure 3-4 compare les dépendances angulaires obtenues, pour des mélanges équimolaires à 0.15 mM de protéine totale incubés 15 minutes à 45 et 25°C dans un tampon à 39 mM de force ionique, juste après dilution à 0.01 mM de protéine totale et après plusieurs heures à plusieurs jours d'incubation à température ambiante.

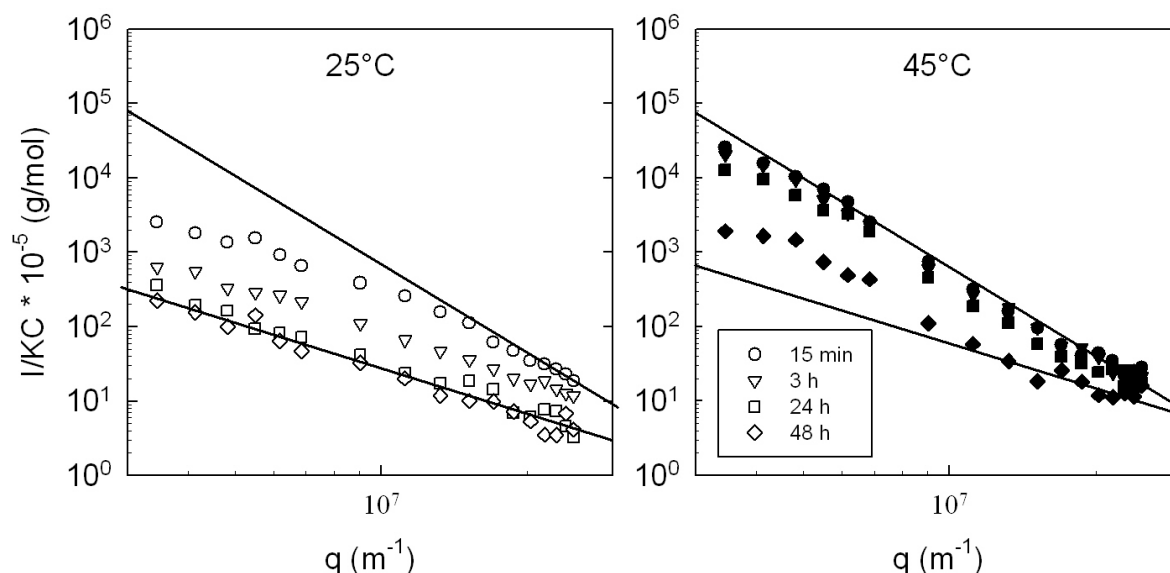


Figure 3-4 : Dépendances angulaires de l'intensité diffusée par des mélanges équimolaires (0.15 mM de protéine totale) incubés 15 min à 25°C (symboles blancs) et 45°C (symboles noirs) après dilution à 0.01 mM (cercles) et incubation à température ambiante pendant (3 h, 24 h et 48 h). Les mesures ont été réalisées à 20°C. Les droites représentées ont une pente égale à -2 et -4.

Après dilution et incubation à température ambiante, l'intensité de lumière diffusée diminue à tous les angles. La diminution d'intensité mesurée n'est pas due à la sédimentation des particules car le signal obtenu après homogénéisation des suspensions était comparable. Par conséquent, la proportion de protéines assemblées et la masse molaire apparente des particules diminuent. La dilution semble donc entraîner une libération en solution de protéines assemblées.

En effet, la dépendance angulaire initiale en q^{-4} (observée à 45°C), est perdue au cours du temps, ce qui illustre une diminution de la densité des particules (*Baussay et al. 2006*). Leur structure interne n'est plus homogène. Après 24 h d'incubation à température ambiante, les dépendances angulaires des échantillons préparés à 25°C, sont linéaires et proportionnelles à q^{-2} . Cette dépendance est caractéristique d'agrégats aléatoires (*Croguennoc et al. 2001*). La suspension obtenue par incubation à 45°C semble légèrement plus stable après dilution puisque la dépendance en q^{-2} n'est pas parfaitement atteinte après deux jours d'incubation. Cependant des mesures réalisées après dilution et incubation à température ambiante d'échantillons préparés à des températures intermédiaires n'ont pas montré de différence significative de stabilité. Les différences observées ici entre 25 et 45°C ne sont donc pas significatives.

D'autre part, l'estimation du rayon hydrodynamique des particules après dilution montre que celui-ci est relativement constant au cours du temps (Figure 3-5), les variations observées sont dans la gamme d'erreur (± 100 nm). La taille des particules semble donc constante après dilution.

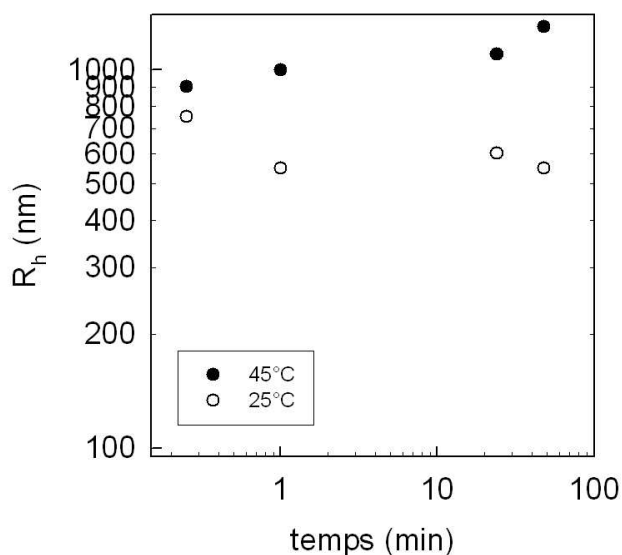


Figure 3-5 : Evolution du rayon hydrodynamique (R_h) des particules formées à 25°C (blanc) et 45°C (noir) en fonction du temps d'incubation à température ambiante après dilution à 0.01 mM de protéine totale.

Puisque le rayon hydrodynamique des particules est constant alors que leur masse molaire apparente diminue, la dilution des suspensions semble donc entraîner une altération des particules par libération en solution de protéines assemblées provenant de l'intérieur des particules plutôt qu'une érosion des particules en périphérie.

Ces résultats sont comparables à ceux obtenus précédemment par microscopie électronique à transmission (Figure 3-6) lors de la déstabilisation des microsphères par ajout de calcium. (*Nigen et al. 2010*). En effet, la densité des microsphères est altérée de la périphérie vers le centre mettant en évidence une libération de protéines assemblées. Cependant une couronne de protéines assemblées semble être conservée. Il serait intéressant de suivre cette réaction par diffusion de lumière pour confirmer la diminution d'intensité de lumière diffusée combinée à un rayon hydrodynamique constant.

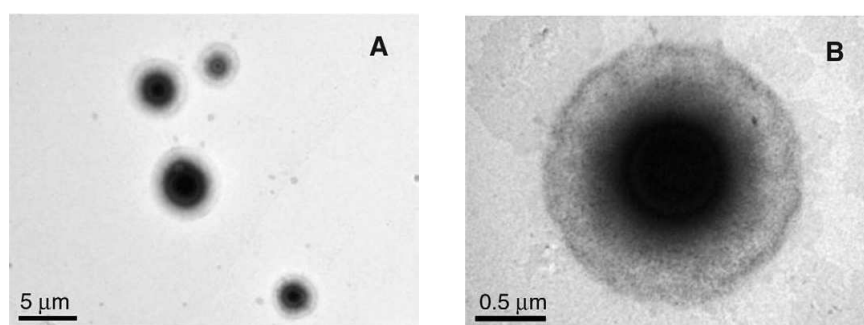


Figure 3-6 : Observations par microscopie optique des microsphères (obtenues à 0.2 mM en concentration totale en protéines dans 30 mM Tris-HCl contenant 15 mM NaCl, pH 7.5 après 30 minutes d'incubation à 45°C) après ajout de 0.1 mM CaCl_2 et incubation 15 minutes à 45°C. (*Nigen et al. 2010*)

En conclusion, la dilution des échantillons permet de stopper la croissance des particules sur un temps court mais provoque une déstabilisation partielle des particules sur des temps plus long (heures) par libération en solution de protéines provenant de l'intérieur des particules.

3.2.4. Dépendances angulaires en fonction de la force ionique

A pH 7.5, la force ionique du milieu est probablement le paramètre physico-chimique le plus important dans la formation des objets puisque ceux-ci résultent d'interactions électrostatiques entre l'apo α -lactalbumine et le lysozyme. C'est pourquoi nous avons également mesuré l'intensité de lumière diffusée en faisant varier la force ionique autour de la force ionique standard (39 mM) (Figure 3-7).

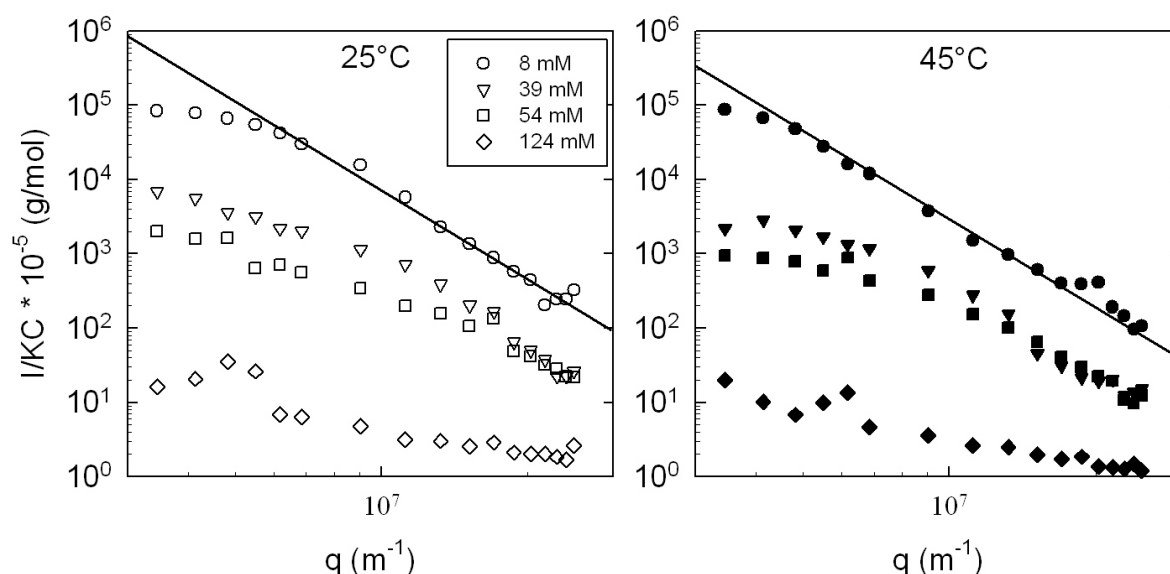


Figure 3-7 : Dépendances angulaires en fonction de la force ionique du milieu (8, 39, 54, 124 mM) obtenues après 15 minutes d'incubation de mélanges équimolaires à 0.15 mM de protéine totale à 25°C (symboles blancs) et 45°C (symboles noirs). Les mesures ont été réalisées à 20°C après dilution des mélanges à 0.01 mM. Les droites représentées ont une pente égale à -4.

Après 15 minutes d'incubation, l'intensité diffusée diminue à tous les angles pour des forces ioniques croissantes, ce qui signifie que la taille des particules et la quantité de protéines assemblées diminuent lorsque la force ionique augmente. Ces résultats sont en adéquation avec ceux précédemment obtenus (*Nigen et al. 2009*). En effet une force ionique élevée écranter les charges portées à la surface des protéines et réduit donc les interactions électrostatiques attractives. A nouveau, les signaux obtenus par incubation à 25 et 45 °C sont comparables.

Pour savoir si l'intensité de lumière diffusée et donc la quantité de particules formées augmentent au cours du temps, des échantillons préparés à des forces ioniques supérieures à 39 mM ont été incubés à 45°C pendant plusieurs heures. La Figure 3-8 compare les dépendances angulaires obtenues suite à cette incubation prolongée à celle mesurée après 15 minutes d'incubation. Dans ce cas les mesures ont été réalisées sans dilution des échantillons. En effet l'augmentation de la force ionique permet de limiter l'assemblage à 0.15 mM de protéine totale et les interactions inter-particules sont négligeables ($S(q)=1$).

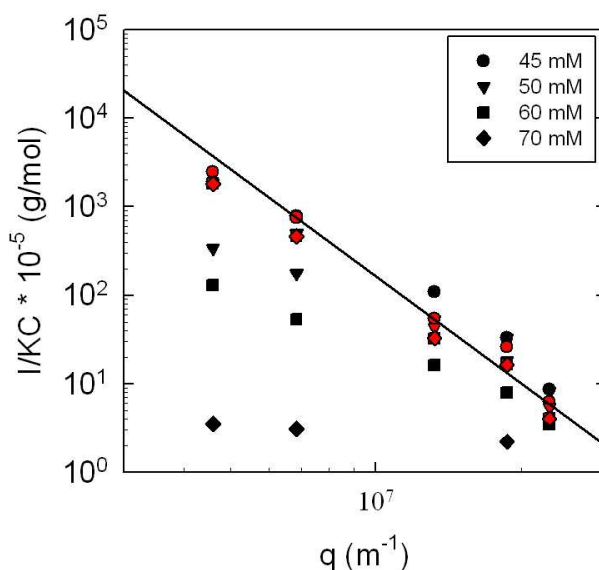


Figure 3-8 : Dépendances angulaires en fonction de la force ionique du milieu (45, 50, 60, 70 mM) obtenues après 15 minutes d'incubation à 45°C de mélanges équimolaires à 0.15 mM de protéine totale (symboles noirs) et après 3, 4, 6 et 7 h d'incubation à 45°C des échantillons de force ionique respectivement égale à 45, 50, 60, 70 mM (symboles rouge). Les mesures ont été réalisées à 45°C sans dilution. La droite représentée a une pente égale à -4.

Les résultats obtenus montrent que le même état final est obtenu. En effet après plusieurs heures d'incubation à 45°C, les courbes se superposent et montrent une dépendance en q^{-4} , ce qui signifie que toutes les suspensions obtenues sont constituées de particules homogènes.

L'augmentation de la force ionique permet donc de réduire la proportion de protéines assemblées mais également de ralentir la formation de suspensions de particules homogènes.

En définitive, les paramètres permettant de ralentir significativement la réaction de formation sont la concentration en protéine (faible) et la force ionique du milieu (élevée). L'effet de la température sur le facteur de forme des particules observées par diffusion de lumière est négligeable dans la gamme étudiée. Ainsi les études en temps réel (**Article 2**) ont été réalisées en mesurant l'intensité de lumière diffusée à un angle fixe, 20° qui correspond à $q = 4.6 \cdot 10^{-3} \text{ nm}^{-1}$, en faisant varier la concentration totale en protéines (0.02-0.2 mM) et la force ionique du milieu dans une gamme s'échelonnant de 15 à 70 mM. Les mesures aux faibles forces ioniques ont été réalisées en utilisant des faibles concentrations en protéine pour limiter la taille des particules formées. Les travaux présentés ont également permis de caractériser davantage l'influence de la température sur la vitesse de croissance des particules et la morphologie des objets formés.

3.3. Résumé détaillé de l'article 2

Les mesures d'intensité de la lumière diffusée réalisées en temps réel ont permis de calculer la vitesse de croissance des particules en fonction de la concentration totale en protéines et de la force ionique.

Quelques soient les conditions utilisées, l'intensité de lumière diffusée augmente linéairement avec le temps d'incubation puis stagne lorsque les particules atteignent une taille supérieure à l'inverse du vecteur d'onde ($R_g \cdot q \gg 1$ avec $q^{-1} \sim 200 \text{ nm}$) du fait d'interférences entre sous-unités des particules. L'intensité initiale du mélange est supérieure à l'intensité théorique calculée à partir des intensités mesurées pour des solutions pures de protéines. Cette observation illustre le caractère spontané de l'assemblage qui empêche l'observation de la phase de nucléation.

La pente de la partie linéaire correspond à la vitesse de croissance des particules au stade initial du mécanisme. Ainsi nous avons montré que la vitesse de croissance diminue d'un facteur 1000 lorsque la concentration diminue d'un facteur 10 ou que la force ionique augmente d'un facteur 2. Ces relations sont comparables à 25 et 45°C. Par conséquent, cette première étape de croissance des particules est indépendante de la température. Le rayon hydrodynamique augmente selon la racine cubique du temps, quelque soit la température et le couple concentration/force ionique utilisées. Ainsi, l'augmentation linéaire de l'intensité de lumière au cours du temps et la dépendance du rayon hydrodynamique selon $R_h \propto t^{1/3}$, sont en

faveur d'un processus d'agrégation où les particules croissent par collision et fusion de petites particules. La comparaison des résultats obtenus avec ceux obtenus par modélisation d'un tel processus limité par la diffusion (DLCA pour Diffusion Limited Cluster Aggregation) des particules, c'est-à-dire où chaque collision mène à la fusion des particules, a montré que dans ce système une collision sur dix menait à la fusion de petites particules.

Les valeurs de R_h obtenues par diffusion dynamique de la lumière ne sont valides que pour des valeurs inférieures à 1 μm . Pour compléter l'échelle d'observation, nous avons utilisé la microscopie confocale à balayage laser (CLSM). Les particules de petite taille, identifiées par diffusion de lumière comme des particules sphériques monodisperses présentant une structure interne homogène (dépendance en q^{-4}) ont été observées au début de l'incubation de mélange équimolaires à 25 et 45°C. L'incubation prolongée mène comme attendu à la formation d'agrégats amorphes à 25°C et à la formation de microsphères à 45°C. Comme précédemment démontré (*Nigen et al. 2007*), nous avons également observé que l'incubation à 45°C de la suspension d'agrégats amorphes (obtenus à 25°C) permet d'obtenir les microsphères. Il semble donc qu'à 25°C les particules soient maintenues sous forme d'agrégats par une force de résistance à la fusion, alors que les microsphères formées à 45°C par coalescence sont plus stables du fait d'une réduction de l'énergie libre de surface du système.

L'ensemble des résultats obtenus nous a permis de proposer le mécanisme d'assemblage suivant. Une proportion définie de protéines forme des agrégats dès le mélange. Des particules monodisperses sphériques et homogènes sont ensuite formées par collision et fusion de petites particules. Cette étape de croissance est indépendante de la température dans la gamme étudiée. Cependant, après plusieurs minutes d'incubation lorsque les particules ont atteint une taille limite, le processus d'assemblage se distingue selon la température appliquée. Des agrégats amorphes sont formés à 25°C par agrégation de particules sphériques homogènes alors que l'agrégation de celles-ci à 45°C est suivie de leur fusion et leur réorganisation en objets sphériques de plus grande taille. Bien que la résistance à la fusion soit susceptible d'être réduite par augmentation de la température, l'état conformationnel de l'apo α -lactalbumine joue probablement un rôle important à ce stade du mécanisme. En effet les microsphères ne sont obtenues qu'à 45°C lorsque l'apo α -lactalbumine adopte un état « molten globule ». Cette conformation très dynamique et flexible facilite probablement la coalescence des particules et leur réorganisation en microsphères.

3.4. Article 2



ARTICLE

pubs.acs.org/Biomac

Kinetics and Structure during Self-Assembly of Oppositely Charged Proteins in Aqueous Solution

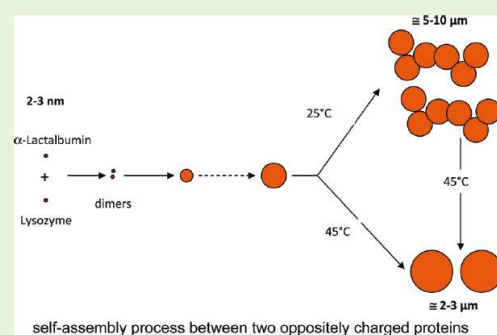
Delphine Salvatore,^{†,‡} Thomas Croguennec,[†] Saïd Bouhallab,^{*,†} Vincent Forge,[‡] and Taco Nicolai[§]

[†]UMR 1253, INRA, Agrocampus-Ouest, STLO, 65 rue de Saint Briec, F-35042, Rennes, France

[‡]UMR 5249, Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux, CEA-Grenoble, 17, rue des Martyrs, F-38057, Grenoble, France

[§]Polymères, Colloïdes, Interfaces, UMR CNRS Université du Maine, F-72085, Le Mans, France

ABSTRACT: Self-assembly in aqueous solution of two oppositely charged globular proteins, hen egg white lysozyme (LYS) and bovine calcium-depleted α -lactalbumin (apo α -LA), was investigated at pH 7.5. The aggregation rate of equimolar mixtures of the two proteins was determined using static and dynamic light scattering as a function of the ionic strength (15–70 mM) and protein concentration (0.28–2.8 g/L) at 25 and 45 °C. The morphology of formed supramolecular structures was observed by confocal laser scanning microscopy. When the two proteins are mixed, small aggregates were formed rapidly that subsequently grew by collision and fusion. The aggregation process led on larger length scales to irregularly shaped flocs at 25 °C, but to monodisperse homogeneous spheres at 45 °C. Both the initial rate of aggregation and the fraction of proteins that associated decreased strongly with decreasing protein concentration or increasing ionic strength but was independent of the temperature.



INTRODUCTION

Self-assembling of proteins into various supramolecular structures (aggregates, fibres, nanotubes, spherulites, etc.) is a widespread phenomenon in biological science.^{1–4} Understanding the mechanism of protein assembly is important for applications in areas such as pharmacy, food, and medicine. For instance, it could lead to an extension of the use of protein in delivery systems⁵ by a proper control of the nature and the properties of the supramolecular structures. The mechanism of formation of supramolecular structures and their shape depend on the type and balance of attractive and repulsive interactions between proteins during the self-assembly process.⁶ Hence, they strongly depend on the physicochemical conditions of the medium (pH, temperature, ionic strength, protein concentration, etc.). Most studies in this field are focused on single protein systems and often the objective is to elucidate the fibrillation mechanism of proteins or peptides.^{7–9} However, understanding protein assembly involving more than one type of protein is also of fundamental interest and can potentially lead to the elaboration of protein assemblies with novel functionalities.¹⁰

In previous studies, we investigated the self-assembly of two oppositely charged globular proteins, hen egg white lysozyme (LYS) and bovine calcium-depleted α -lactalbumin (apo α -LA), in aqueous solution.¹¹ α -LA and LYS are related proteins with 123 and 129 amino acid residues, respectively, for which about 40% of the amino acid sequence is the same and that have similar three-dimensional structures containing four disulfide bonds.¹² However, they have a different biological function, different stability, and widely different isoelectric points (pI). The apo form of α -LA has a pI between 4 and 5 and a denaturation

temperature defined as the midpoint of the thermal transition T_m of about 27 °C, while LYS is a basic protein with a pI value of 10.7 and a higher denaturation temperature with a T_m of about 74 °C.^{13,14} At pH 7.5, the proteins have the same net charge, but with opposite sign.

When mixed in an aqueous buffer at pH 7.5, these two proteins can assemble into homogeneous spherical particles with a radius of a few micrometers.¹¹ It was shown that at the molecular level, LYS and apo α -LA interact via electrostatic forces to form heterodimers that are the building blocks for further self-assembly into spherical particles.¹⁵ Major factors influencing the self-assembly process between these two proteins are temperature and ionic strength.^{11,16} The ability of both proteins to form spherical particles, the rate of their formation as well as their final size were found to be strongly dependent on the ionic strength of the solution. Increasing the ionic strength reduced the ability of the proteins to self-assemble and at high ionic strengths ($C_{\text{salt}} > 124$ mM) self-assembly between LYS and apo α -LA was no longer observed. A similar effect of the ionic strength was reported by Biesheuvel et al. for the self-assembly in mixtures of oppositely charged native and modified lysozyme.¹⁷ The effect is attributed to screening of the charges on the protein surfaces that reduces the electrostatic attraction needed for protein self-assembly.¹⁸ Interestingly, the temperature was shown to be a crucial parameter that governs the final organization of the

Received: February 25, 2011

Revised: March 25, 2011

macromolecular structures formed by LYS and apo α -LA. At 25 °C and lower temperatures, aggregates with irregular shapes were formed, while monodisperse homogeneous spherical particles were formed at 45 °C. The latter contained the same number of both proteins. Equimolar mixtures are optimal for the formation of spherical particles, but they are also formed in mixtures with different ratios of the two proteins.

To complete our previous work on this fascinating self-assembly process, the purpose of the present study is to gain more insight on the kinetics and involved mechanism. We report here for the first time what happens between heterodimers and macroscopic objects. To this end, light scattering techniques were used to study the kinetics of the aggregation after mixing as a function of the temperature, the ionic strength and the protein concentration. The size of the aggregates was determined as a function of time. We will show that the first step of the self-assembly involves formation of small aggregates (nuclei) during mixing that subsequently grow by a random aggregation process. This step was independent of the temperature and is followed by a temperature-dependent reorganization into different morphologies on length scales larger than a micrometer, which were studied by confocal laser scanning microscopy (CLSM).

MATERIALS AND METHODS

Materials. Commercial lysozyme (LYS) was purchased from Ovonor and contained 95% of LYS and 3% of chloride ions. Holo α -LA was purified from bovine whey by ion exchange chromatography as reported by Caussin et al.¹⁹ The resulting powder contained 95% of holo α -LA. Apo α -LA was prepared by dialysis of a solution of holo α -LA against deionized water at pH 3 during 48 h at 4 °C using a dialysis membrane (Spectrum Laboratories, U.S. and Canada) with a nominal cut off of 6–8000 Da in order to remove calcium ions. The pH of the apo α -LA solution was adjusted to pH 7 with 1 M NaOH and then freeze-dried. The calcium content in the apo α -LA powder was analyzed by atomic absorption spectrometry on a SpectrAA 220FS (Varian, Les Ulis, France). The Ca/ α -LA molar ratio was 19%, and hence, the powder contained a fraction of holo form of the protein. For studies at different ionic strengths, LYS and apo α -LA powders were solubilized in several Tris/HCl buffers prepared with or without added sodium chloride to obtain final ionic strengths ranging from 15 to 70 mM at a constant pH of 7.5 considering the ionization degree of the buffer.

Stock solutions of LYS and apo α -LA were prepared by solubilization of protein powders in buffer with desired ionic strengths, pH 7.5. They were filtered through a 0.2 μ m membrane (Anatope) before preincubation at working temperature. The protein concentration was determined by measuring the absorbance at 280 nm using extinction coefficients of 2.01 and 2.64 L/g·cm for apo α -LA and LYS, respectively. Equimolar quantities of both proteins were mixed either at 25 or 45 °C to reach the desired total protein concentration.

Protein Quantification by Reverse Phase HPLC. The fraction of self-assembled proteins was quantified by centrifugation of the samples (0.5 mL) at 12000 g during 30 min. Supernatants were recovered and pellets containing assembled proteins were washed with buffer, pH 7.5, and dissolved in 0.5 mL of buffer A. Buffer A consisted of Milli-Q water containing 1.06% (v/v) trifluoroacetic acid. Samples were diluted 100 \times in buffer A before injection. Reverse phase separation was performed on a Vydac C₄214TPS215 column connected to an HPLC system, consisting of a Waters 2695 Separations Module, a Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector, and an Empower software (Waters) to acquire, process, and report chromatographic profiles. Buffers A and B consisting of an acetonitrile–Milli-Q water mixture (80:20% (v/v)) containing 1% (v/v) trifluoroacetic acid were used for protein elution.

The gradient started with 20% of buffer B to reach 84% in 22 min. Protein separation was carried out at a flow rate of 0.2 mL/min at 40 °C. Proteins were detected simultaneously at 214 and 280 nm.

Dynamic and Static Light Scattering. Light scattering measurements were done using a commercial apparatus (ALV/CGS3; ALV-Langen, Germany). The light source was a He–Ne laser with wavelength $\lambda = 632$ nm. The normalized scattering intensity (I_n) was calculated as the intensity minus the solvent scattering divided by the scattering intensity of toluene at 20 °C and normalized by the total protein concentration (C).

In dilute solutions I_n is related to the weight average molar mass (M_w) and the structure factor ($S(q)$) of the solute:^{20,21}

$$I_n = H \cdot M_w S(q) \quad (1)$$

with H an optical constant:

$$H = \frac{4\pi^2 n_s^2}{\lambda^4 N_A} \left(\frac{\partial n}{\partial C} \right)^2 \left(\frac{n_{\text{tol}}}{n_s} \right)^2 \frac{1}{R_{\text{tol}}} \quad (2)$$

Here N_A is Avogadro's number, $(\partial n / \partial C)$ is the refractive index increment, R_{tol} is the Rayleigh constant of toluene at 20 °C, n_{tol} and n_s are the refractive indices of toluene and the solvent, respectively, and $(n_{\text{tol}}/n_s)^2$ corrects for the difference in the scattering volume of the solution and the solvent. We have used $(\partial n / \partial C) = 0.189$ mL·g^{−1} and $R_{\text{tol}} = 1.35 \times 10^{-5}$ cm^{−1}.²² The structure factor describes the dependence of the intensity on the scattering wave vector ($q = (4 \cdot \pi \cdot n_s / \lambda) \times \sin(\theta/2)$), with θ representing the angle of observation) and depends on the structure and the size of the solute. $S(q) = 1$ if the particles are much smaller than q^{-1} .

The intensity autocorrelation functions were measured and analyzed in terms of a distribution of relaxation times by performing a Laplace inversion using the routine developed by Contin that was implemented by the ALV-Langen company. In most cases, a narrow single relaxation time distribution was observed. The average relaxation rate was found to be proportional to q^2 and from the slope the diffusion coefficient (D) was determined. The hydrodynamic radius (R_h) was calculated using the Stokes–Einstein equation:

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R_h} \quad (3)$$

with η = the viscosity, k = Boltzman's constant, and T = the absolute temperature.

Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM). CLSM was used in the fluorescence mode. Observations were made with a Leica TCS-SP2 (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany). A water immersion objective lens was used (HCX PL APO 63 \times NA = 1.2) with a theoretical resolution of 0.3 μ m in the x – y plane. The proteins were labeled with the fluorochrome rhodamine B isothiocyanate (Rho) by adding a 5 ppm of a concentrated rhodamine solution to the solutions before mixing. Rho was excited using a helium–neon laser with wavelength 543 nm, and the fluorescence was detected with a photomultiplier.

RESULTS

Kinetics. The kinetics of the aggregation process was investigated by measuring the scattered light intensity as a function of time after mixing the two proteins. Aqueous solutions of LYS and α -LA at pH 7.5 with the same molar concentration were rapidly mixed and immediately inserted into the apparatus. The effect of the total protein concentration was studied between $C = 0.28$ and 2.8 g/L at a fixed ionic strength of $C_{\text{salt}} = 39$ mM, and the effect of the ionic strength was studied between 15 and 70 mM at two total protein concentrations: 0.7 and 2.1 g/L. Experiments were

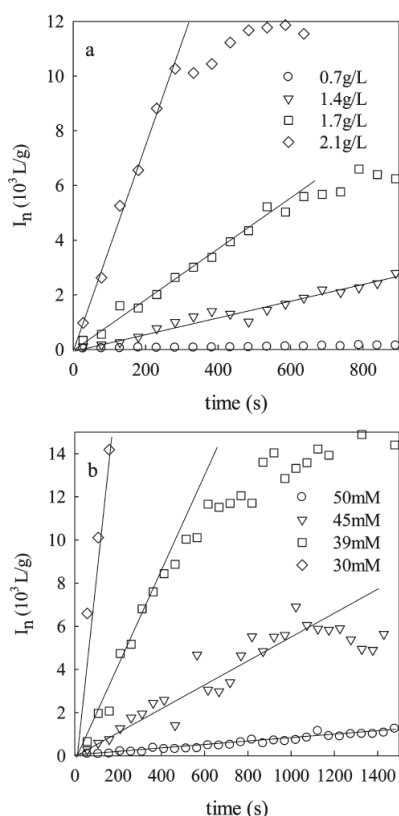


Figure 1. Evolution of the normalized scattering intensity I_n at 25 °C at different protein concentrations C for $C_{\text{salt}} = 39$ mM (a) and at different ionic strengths for protein concentration $C = 2.1$ g/L (b); $\theta = 20^\circ$, $q = 4.6 \times 10^{-3} \text{ nm}^{-1}$.

made at two temperatures (25 and 45 °C) that led to different supramolecular structures at steady state, as shown below.

Examples of the evolution of the normalized scattering intensity I_n at different protein concentrations at $C_{\text{salt}} = 39$ mM or at different ionic strengths at fixed total protein concentration $C = 2.1$ g/L are shown in Figure 1a and b, respectively. I_n increased initially approximately linearly with time at a rate that increased rapidly with increasing protein concentration and decreasing ionic strength. For the more rapidly evolving systems, stabilization of the scattering intensity could be observed at longer times. The reason for the stabilization is that the measurements were done at a single scattering angle (20°) corresponding to a scattering vector $q = 4.6 \times 10^{-3} \text{ nm}^{-1}$. As long as the radius of the protein aggregates (R) is smaller than q^{-1} , the I_n is proportional to their molar mass. However, when they become larger, intramolecular interference reduces I_n . I_n is no longer sensitive to the aggregate size if $qR_g \gg 1$, see below, which is the reason why it stagnates at longer times. Measurements after dilution showed that the effect of interactions on the scattering intensity was negligible.

The measurements shown in Figure 1 were done at 25 °C, but the results obtained at 45 °C were similar. The aggregation rate was characterized by the initial slope of I_n versus time. Figure 2 shows dI_n/dt as a function of C for $C_{\text{salt}} = 39$ mM (a) and as a function of C_{salt} for two total protein concentrations, that is, 0.7 and 2.1 g/L (b) in a semilogarithmic representation. dI_n/dt increased by more than a factor 1000 when C was increased by a factor of 10 or when the ionic

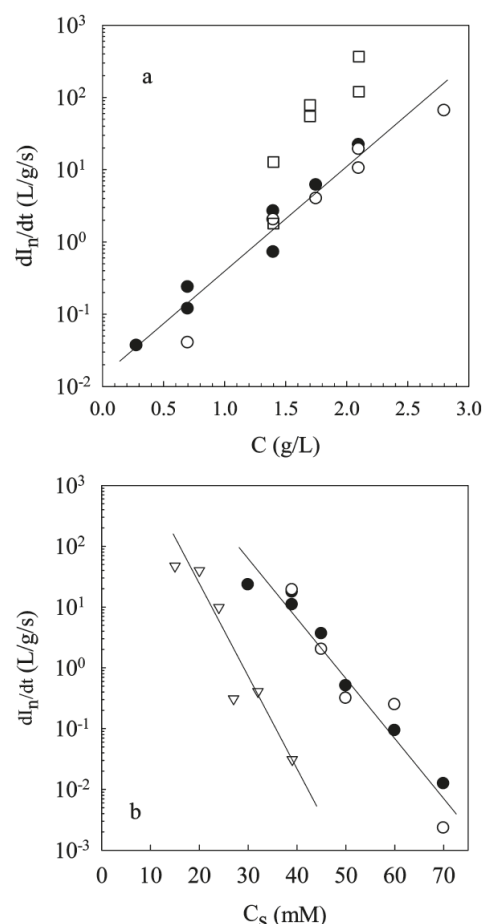


Figure 2. dI_n/dt as a function of protein concentration C in a semilogarithmic representation for $C_{\text{salt}} = 39$ mM (a) and as a function of C_{salt} for 0.7 g/L (circles) and 2.1 g/L (triangles) (b). Data obtained at 45 °C are indicated by open symbols at 25 °C by closed symbols. The squares represent values that were calculated using the DLCA model with the fractions of aggregated proteins indicated in Table 1. The solid lines are guides to the eye.

strength was decreased by a factor of 2. In the concentration and ionic strength ranges covered here, dI_n/dt increased exponentially with increasing C and decreased exponentially with increasing C_{salt} . Within the scatter of the data there is no difference between the aggregation rate at 25 and 45 °C. Trials at intermediate temperatures confirmed that the evolution of the system as observed by light scattering techniques is independent of the temperature at least in this relatively narrow range.

The reproducibility of the evolution of I_n was tested by repeating measurements. The spread in the results was much smaller if the same solutions were used than if independently prepared solutions were used. Values of dI_n/dt obtained with the same solutions were averaged, but results obtained with independently prepared solutions are shown separately in Figure 2. The relatively large scatter of the data is probably caused by the high sensitivity to small variations of the ionic strength, the pH, and the protein concentration.

Structure Factor. The q -dependence of the scattering intensity of the system was determined at different stages of the

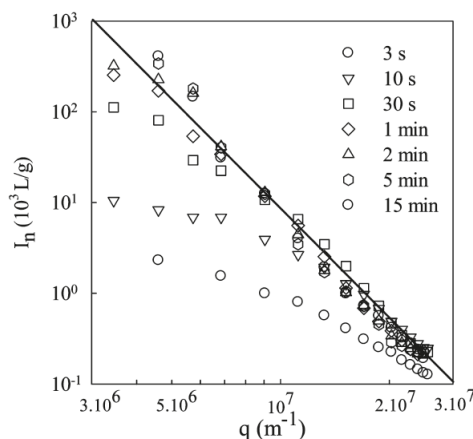


Figure 3. q -Dependence of I_n at different times after mixing for protein concentration $C = 2.8$ g/L and $C_{\text{salt}} = 39$ mM at 45°C . Measurements were done after dilution to $C = 0.14$ g/L at 25°C .

aggregation process. Small aliquots were taken at different times and rapidly diluted by more than a factor 10. Dilution arrested the aggregation process, but it led to a very slow decrease of I_n over a period of days that indicates that the aggregates were not fully stable. However, the decrease in the intensity after dilution was negligible for the duration of the experiment. Examples of the q -dependence of I_n at different times after mixing are shown in Figure 3 for $C = 2.8$ g/L and $C_{\text{salt}} = 39$ mM at 45°C . Immediately after mixing the two proteins, I_n was still independent of q at lower values for which $qR < 1$, but the aggregates grew quickly, and after a few minutes, the q -dependence could be approximated by a power law dependence: $I_n \propto q^{-4}$. This q -dependence is characteristic for scattering from interfaces and implies that the aggregates are homogeneous. Experiments at other ionic strengths, protein concentrations, and temperatures showed the same q -dependence when the aggregates were large. I_n at larger values of q did not change significantly after 10 s, which could mean that the local structure of the aggregates does not change with time. We notice that, as the aggregation progressed, light scattering measurement became increasingly difficult due to the formation of very large particles visible in CLSM. The effect was especially pronounced at smaller q -values.

Hydrodynamic Radius. The hydrodynamic radius (R_h) was measured using dynamic light scattering. All intensity autocorrelation functions ($g_2(t)$) could be well described by a single exponential decay as shown in Figure 4. The relaxation rate (Γ) was proportional to q^2 , which is expected for translational diffusion: $\Gamma = 2Dq^2$. Here we observed $\Gamma \propto q^2$ also when $qR \gg 1$, see inset of Figure 4. The implication is that we are probing the diffusion of monodisperse homogeneous spherical particles, because otherwise the correlograms would show the effect of rotational diffusion and polydispersity.

If interactions can be neglected, the diffusion coefficient is related to the hydrodynamic radius, see eq 3. At lower concentrations, the evolution of the system was slower and correlograms at a single scattering angle (20°) could be determined in situ as a function of time. The values of R_h as a function of time are plotted in Figure 5 for $C = 2.8$ g/L and $C_{\text{salt}} = 39$ mM at 25 and 45°C . The increase of R_h with time was independent of the temperature and could be well described by a power law: $R_h \propto t^{1/3}$, see solid lines in Figure 5. The evolution of R_h at

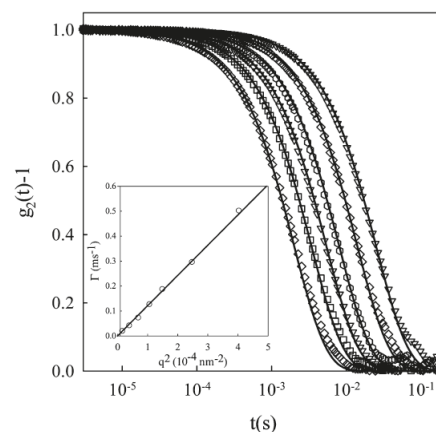


Figure 4. Examples of intensity autocorrelation functions obtained at different scattering wave vectors. The solid lines represent single exponential decays. The inset shows the linear dependence of the relaxation rate on q^2 .

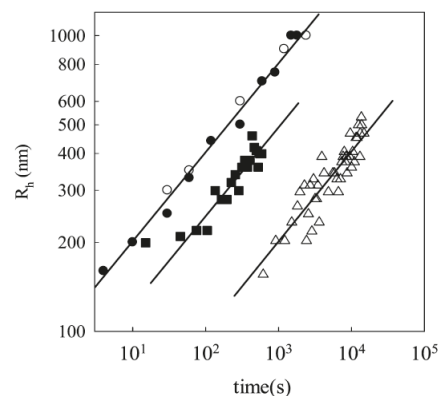


Figure 5. R_h as a function of time for $C_{\text{salt}} = 39$ mM at three different protein concentration: $C = 2.8$ g/L (circles), $C = 2.1$ g/L (squares), $C = 0.7$ g/L (triangles), at 25°C (open symbols) or at 45°C (closed symbols; $\theta = 20^\circ$, $q = 4.6 \times 10^{-3} \text{ nm}^{-1}$). The slope of the solid lines is $1/3$.

$C = 2.1$ g/L at 45°C and 0.7 g/L at 25°C is also shown in Figure 5. The data are more scattered because they represent short time measurements at only a single scattering angle. Nevertheless, it is clear that in each case the increase follows approximately a power law with exponent $1/3$.

CLSM. When R_h exceeded $1 \mu\text{m}$, light scattering no longer yielded reliable results. However, the system could also be investigated using CLSM, which allows one to observe features at length scales larger than about 100 nm . For observation with CLSM, the proteins need to be fluorescently labeled, but it was verified that labeling had no effect on the evolution of the system.²³ A system at $C = 2.1$ g/L and $C_{\text{salt}} = 39$ mM was observed at 25°C as a function of time, starting a few minutes after mixing. Images taken at different times are shown in Figure 6. Initially, small particles were observed, which light scattering experiments showed to be monodisperse homogeneous spheres. At longer times the spheres assembled into larger clusters that slowly precipitated. After a few hours, all particles had sedimented onto the coverslip in the form of randomly

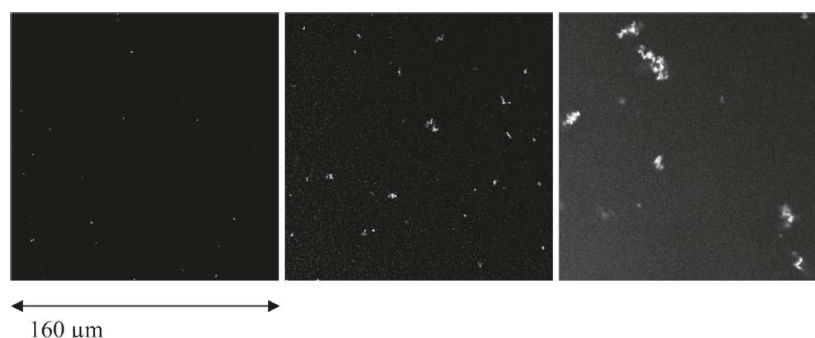


Figure 6. Confocal microscopy images of LYS/apo α -LA equimolar mixture ($C = 2.1$ g/L, $C_{\text{salt}} = 39$ mM) at different times after mixing at 25 °C: a few minutes (left); 15 min (middle); a few hours (right). The left and middle images were obtained 50 μm above the coverslip, while the right image was taken near the coverslip.

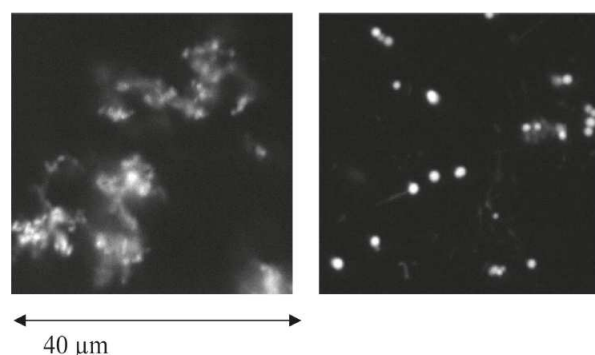


Figure 7. Confocal microscopy images of LYS/apo α -LA ($C = 2.1$ g/L, $C_{\text{salt}} = 39$ mM) a few hours after mixing at 25 °C (left) and the same solution after heating for a few minutes at 45 °C (right). In both cases, the images were taken close to the coverslip.

branched clusters. The supernatant still contained about two-thirds of the proteins, but no particles were visible.

A second solution was heated in a water bath at 45 °C and subsequently observed at 25 °C. In this case, larger well-defined spherical particles were observed either individually or in the form of small clusters. Here also after a few hours, all particles had sedimented and the supernatant still contained a large fraction of protein. Remarkably, the same spherical particles could also be made starting from the irregular clusters that were formed at 25 °C by heating the solution a few minutes at 45 °C, see Figure 7.

The fraction of proteins that was incorporated in the aggregates (F) was determined about 40 min after mixing by measuring the protein content of the supernatant after centrifugation of the solutions for 30 min at 12000 g, which resulted in sedimentation of all aggregated protein. The results obtained at different conditions, shown in Table 1, confirm earlier reports that the fraction of proteins that aggregates strongly decreased either by increasing ionic strength or throughout decreasing total protein concentration.¹⁶ However, here we found systematically smaller values of F . We believe that the difference is related to a larger amount of residual calcium ions and thus the larger fraction of holo α -Lac in the protein powder used for this study. Preliminary measurements showed that the fraction of reactive proteins strongly depends on the amount of calcium ions. This issue will need to be investigated in detail in future work.

Table 1. Fraction (F) of Aggregated Proteins at 25 and 45 °C under Different Protein and Buffer Ionic Strengths

total protein concentration (g/L)	ionic strength C_{salt} (mM)	F (%) 25 °C	F (%) 45 °C
2.1	24	31	31
2.1	30	18	19
2.1	39	2	3.5
2.8	39	11	12.5
1.7	39	1.5	1.5
1.4	39	0.3	0.8

DISCUSSION

Lysozyme and apo α -lactalbumin self-assemble and form supramolecular structures in narrow ranges of pH, protein concentration, and ionic strength. Interestingly, depending on the temperature, different shapes of the supramolecular structure were observed at the microscopic length scale: well-defined spherical aggregates were formed at 45 °C, while aggregates with irregular shapes were obtained at 25 °C. However, on the length scale covered by light scattering, the structure factor was found to be the same at 25 and 45 °C. Larger aggregates showed a power law dependence of the intensity on q with exponent -4 , which is characteristic for homogeneous structures with a smooth surface.

Increasing the protein concentration or reducing the ionic strength promoted the self-assembly and formation of supramolecular structures. Remarkably, the fraction of proteins that associated was the same within the experimental error at 25 and 45 °C, in spite of the fact that very different morphologies were observed with CLSM. In addition, light scattering experiments showed that the internal structure was the same and that within the experimental error the temperature had no effect on the initial aggregation rate. These observations strongly suggest that the aggregation mechanism is the same at the two temperatures, but that the reorganization on length scales larger than a micrometer is different.

Based on turbidimetry, Biesheuvel et al. reported a temperature-dependent phase separation after mixing two globular proteins of opposite charges (lysozyme and modified lysozyme) in a temperature range similar to that used in our study.¹⁷ Apparently, for the system studied here, electrostatic interactions dominate because the association depended on the ionic strength but not on the temperature in the range tested.

The fraction of proteins that assembles decreases very strongly with increasing NaCl concentration and preliminary measurements showed an even stronger effect when CaCl₂ was added.¹⁶ Ions screen electrostatic interactions between the proteins so that it is expected that adding salt inhibits self-assembly of LYS and α-LA if it driven by electrostatic interaction. A similar phenomenon was described earlier for polymers with opposite charge.²⁴

Biesheuvel et al. suggested that the association of oppositely charged proteins was reversible and led to thermodynamic equilibrium.¹⁷ Indeed, we showed recently for the present system a dynamic exchange between proteins involved in the supramolecular structures and those in the diluted phase.²⁵ In the present study we observed a slow decrease of I_n when the solutions were highly diluted at the same ionic strength. However, we did not see a decrease in the hydrodynamic radius. This means that not all proteins are weakly bound and in dynamic equilibrium but that a significant fraction of the proteins is sufficiently strongly bound to maintain the overall structure. Perhaps nonelectrostatic interactions reinforce protein–protein associations and stabilize the supramolecular structures as was already speculated elsewhere.¹⁶ Thus, aggregation of LYS and apo α-LA did not lead to thermodynamic equilibrium and no phase diagram could be established.

The growth of the aggregates was characterized by a linear increase of I_n with time and $R_h \propto t^{1/3}$. This behavior can be reconciled if we assume that larger homogeneous and spherical aggregates are formed by collision and fusion of smaller aggregates. If each collision leads to fusion, the process is called diffusion limited cluster aggregation (DLCA) and was first described by Chandrasekhar.²⁶ At the start of the measurement, just after mixing, the normalized intensity of the solution ($I_n(0)$) was much larger than that expected for nonaggregated individual proteins. This means that during mixing already small aggregates (nuclei) were formed. These nuclei continued to assemble into larger aggregates and then eventually into supramolecular structures. During DLCA, the weight average number of particles per aggregate (N_w) increases linearly with time:

$$N_w(t) = 1 + Knt \quad (4)$$

where $K = 8RT/3\eta$ is the so-called Smoluchowski rate constant, which represents the diffusion controlled collision rate constant between aggregates; n is the molar concentration of the nuclei at $t = 0$, $n = FC/M_N$, with M_N representing the molar mass of the nuclei and F is the weight fraction of nuclei. For the system studied here, F depended strongly on the ionic strength and the total protein concentration.

Even though F can be quite small, I_n is dominated at all times by the scattering from the aggregates. If $S(q) = 1$, I_n is proportional to the molar mass of the aggregates M_w and, thus, to N_w because $M_w = N_w M_N$

$$I_n(t) = HFM_N N_w(t) \quad (5)$$

When eq 1 is used and applying eq 5 for the monomers for which $S(q) = 1$, it follows that

$$\frac{dI_n}{dt} = HF^2 KC \quad (6)$$

Notice that the rate does not depend on the size of the nuclei.

We calculated dI_n/dt using the values of F in Table 1 and compared the theoretical values with the experimental results in Figure 2a. Clearly, the strong dependence of the aggregation rate

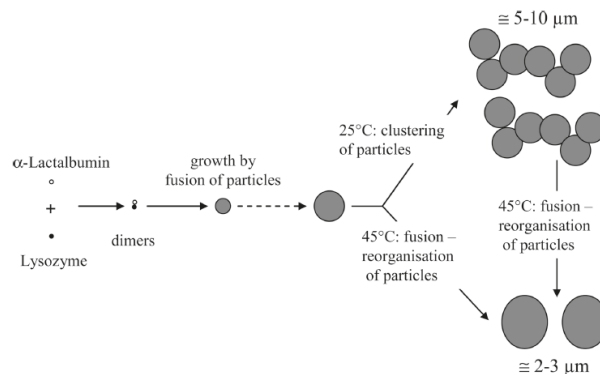


Figure 8. Proposed pathway of LYS/apo α-LA self-assembly at 25 and 45 °C. This pathway is based on dynamic and static light scattering experiments and microscopic observations. During mixing, the proteins interact to form heterodimers as previously reported.¹⁵ These heterodimers are assumed to self-assemble into relatively small aggregates. These aggregates grow by collision-fusion to form larger spherical aggregates at a rate that is independent of the temperature. When the particles have reached a size approaching 1 μm, they assemble into an irregular cluster at 25 °C or into well-defined spherical particles with a diameter of a few micrometers at 45 °C.

on the ionic strength and the protein concentration can be explained by the strong dependence of F on these parameters. However, the experimental aggregation rates are about an order of magnitude slower than the theoretical rates. This means that good agreement with the model predictions is obtained if we assume that only about 1 in 10 collisions led to fusion independently of the ionic strength. The probability to fuse does not depend on the ionic strength, because the screening length is already smaller than the individual proteins at the lowest ionic strength used here. Thus, though ionic strength has a huge effect on the fraction of proteins that associates, it does not affect the growth rate directly. Increasing the ionic strength influences the growth rate only indirectly by decreasing the concentration of reactive proteins.

Clearly, the aggregation process is not a straightforward DLCA process where each collision leads to fusion. An alternative would be reaction limited cluster aggregation (RLCA) where the probability to bind at collision is very small. It is generally assumed that for RLCA the probability to bind increases with increasing aggregation number, which leads to an exponential growth with time with a transition to linear growth only at the late stage.²⁷ However, this is incompatible with our observations. We have shown here that the linear growth and the dependence on the reactive protein concentration can be explained if we assume that the collision rate is diffusion limited and that the probability to bind upon collision is less than unity but is independent of the aggregate size.

We may summarize the self-assembly mechanism between LYS and apo α-LA as follows, see Figure 8: during mixing, a fraction of the proteins forms heterodimers, as was shown elsewhere by fluorescence techniques.¹⁵ The extent of dimerization increases with decreasing ionic strength. The heterodimers rapidly form small aggregates (nuclei) while mixing. These two steps, that is, dimerization and formation of nuclei are very fast. Subsequently, the aggregates grow by collision and fusion, and after each fusion, the aggregates reorganize into homogeneous spherical structures. The growth rate is proportional to the concentration of nuclei and therefore decreases with increasing ionic strength. A small fraction of aggregated proteins form strong

bonds that do not break when the system is highly diluted. This initial stage of the process is independent of the temperature at least between 25 and 45 °C. However, at longer times and on length scales exceeding a micrometer, the aggregation process is different at 25 and 45 °C. Whereas at 45 °C the aggregates continue to fuse and form relatively monodisperse homogeneous spheres, at 25 °C they associate into large irregular flocs. Interestingly, the irregular flocs formed at lower temperatures transform into homogeneous spheres when incubated at 45 °C, while the spheres formed at 45 °C remain stable at low temperatures. This suggests that the spherical form is more stable.

Similar reorganization of aggregates into microspheres has been proposed to explain the formation of films throughout self-assembly of soft particles²⁸ and even amorphous calcium carbonate.²⁹ A decrease of the total surface area of the aggregates of undefined shape (or surface free energy) could be the driving force for such reorganization. Because such reorganization occurred readily at 45 °C but does not occur for days at 25 °C suggests the presence of a barrier against the fusion of the aggregates. Note that this barrier is easily overcome when aggregates formed at 25 °C are subsequently placed at 45 °C for a few minutes. Even if the resistance to fusion is susceptible to decrease as the temperature increases due to the increase of kinetic energy, this is not sufficient to explain the important reorganization between 25 and 45 °C. Instead, the structural features of apo α -LA have to be invoked to explain the different large scale organization at the two temperatures.

The apo form of α -LA is known to adopt a molten globule structure above 30 °C.³⁰ We checked that the transition occurred in the sample used here by measuring the intrinsic fluorescence and circular dichroism (data not shown). The higher flexibility of apo α -LA in the molten globule state may facilitate protein ordering in the aggregates, thus, facilitating fusion as previously suggested by Gauer et al.³¹ Of course, the conformation of the proteins is different during the whole association processes and, thus, might lead to a different local structure of the nuclei formed during mixing and different binding energies. It appears that this does not have a significant influence on the amount of reactive proteins nor on earlier stages of the assembling process, but it may cause the different reorganization seen on length scales larger than a micrometer.

CONCLUSION

In equimolar aqueous mixtures at pH 7.5, hen egg white lysozyme and bovine calcium-depleted α -lactalbumin self-assemble into monodisperse spherical particles with a radius of about 1 μ m at 45 °C or irregularly shaped flocs at 25 °C. The fraction of aggregated proteins and the rate of aggregation decreases strongly with increasing ionic strength and decreasing protein concentration. During mixing, small aggregates are formed by rapid association of the oppositely charged proteins. The subsequent growth of the aggregates can be described in terms of the diffusion limited cluster aggregation model, whereby only 1 in 10 collisions leads to fusion. This process is independent of the temperature, but it leads on larger length scales to irregularly shaped flocs at 25 °C, while at 45 °C these flocs reorganize into well-defined spherical particles.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: said.bouhallab@rennes.inra.fr.

ACKNOWLEDGMENT

We thank Pascaline Hamon (UMR1253 INRA, Rennes) for performing protein quantifications. These investigations were supported by the French National Research Agency (Agence Nationale de la Recherche, Grant ANR-07-PNRA-010, Project LACLYS).

REFERENCES

- (1) Goers, J.; Permyakov, S. E.; Permyakov, E. A.; Uversky, V. N.; Fink, A. L. *Biochemistry* **2002**, *41*, 12546–12551.
- (2) Graveland-Bikker, J. F.; de Kruif, C. G. *Trends Food Sci. Technol.* **2006**, *17*, 196–203.
- (3) Ipsen, R.; Otte, J.; Qvist, K. B. *J. Dairy Res.* **2001**, *68*, 77–286.
- (4) Krebs, M. R. H.; Devlin, G. L.; Donald, A. M. *Biophys. J.* **2007**, *92*, 1336–1342.
- (5) Brange, J. In *Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins*; Frokjaer, S., Hovgaard, L., Eds.; Taylor & Francis: London, 2000; pp 89–112.
- (6) Mossa, S.; Sciortino, F.; Tartaglia, P.; Zaccarelli, E. *Langmuir* **2004**, *20*, 10756–10763.
- (7) Krebs, M. R. H.; Bromley, E. H. C.; Rogers, S. S.; Donald, A. M. *Biophys. J.* **2005**, *88*, 2013–2021.
- (8) Lomakin, A.; Chung, D. S.; Benedek, G. B.; Kirschner, D. A.; Teplov, D. B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1996**, *93*, 1125–1129.
- (9) L  onil, J.; Henry, G.; Jouanneau, D.; Delage, M. M.; Forge, V.; Putaux, J. L. *J. Mol. Biol.* **2008**, *381*, 1267–1280.
- (10) Sanguansri, P.; Augustin, M. A. *Trends Food Sci. Technol.* **2006**, *17*, 547–556.
- (11) Nigen, M.; Croguennec, T.; Renard, D.; Bouhallab, S. *Biochemistry* **2007**, *46*, 1248–1255.
- (12) Qasba, P. K.; Kumar, S. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1997**, *32*, 255–306.
- (13) Shih, P.; Kirsch, J. F. *Protein Sci.* **1995**, *4*, 2063–2072.
- (14) Hendrix, T.; Griko, Y. V.; Privalov, P. L. *Biophys. Chem.* **2000**, *84*, 27–34.
- (15) Nigen, M.; Le Tilly, V.; Croguennec, T.; Drouin-Kucma, D.; Bouhallab, S. *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1794*, 709–715.
- (16) Nigen, M.; Croguennec, T.; Bouhallab, S. *Food Hydrocolloids* **2009**, *23*, 510–518.
- (17) Biesheuvel, P. M.; Lindhoud, S.; de Vries, R.; Cohen Stuart, M. A. *Langmuir* **2006**, *22*, 1291–1300.
- (18) Ou, Z.; Muthukumar, M. J. *Chem. Phys.* **2006**, *124*, 154902–154911.
- (19) Caussin, F.; Famelart, M. H.; Maubois, J. L.; Bouhallab, S. *Lait* **2003**, *83*, 353–364.
- (20) Brown, W. *Light Scattering: Principles and Development*; Clarendon Press: Oxford, U.K., 1996.
- (21) Nicolai, T. *Food Structure Characterisation Using Scattering Methods. In Understanding and Controlling the Microstructure of Complex Foods*; McClements, D. J., Ed.; Woodhead: Cambridge, MA, 2007; pp 288–310.
- (22) Townend, R.; Winterbottom, R. J.; Timasheff, S. N. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 3161–3168.
- (23) Nigen, M.; Croguennec, T.; Madec, M. N.; Bouhallab, S. *FEBS J.* **2007**, *274*, 6085–6093.
- (24) Gummel, J.; Boué, F.; Clemens, D.; Cousin, F. *Soft Matter* **2008**, *4* (8), 1653–1334.
- (25) Nigen, M.; Gaillard, C.; Croguennec, T.; Madec, M. N.; Bouhallab, S. *Biophys. Chem.* **2010**, *146*, 30–35.
- (26) Chandrasekhar, S. *Rev. Mod. Phys.* **1943**, *15* (1), 1–89.
- (27) Odiozola, G.; Moncho-Jorda, A.; Schmitt, A.; Callejas-Fernandez, J.; Martinez-Garcia, R.; Hidalgo-Alvarez, R. *Europhys. Lett.* **2001**, *53*, 797–803.
- (28) Gauer, C.; Wu, H.; Morbidelli, M. *Langmuir* **2009**, *25* (20), 12073–12083.
- (29) Zhong, C.; Chu, C. C. *Langmuir* **2009**, *25*, 3045–3049.
- (30) Griko, Y. V.; Remeta, D. P. *Protein Sci.* **1999**, *8* (3), 554–561.
- (31) Gauer, C.; Wu, H.; Morbidelli, M. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *114*, 1562–1567.

3.5. Conclusions du Chapitre 3 et perspectives

L'étude de la formation des particules par assemblage d'apo α -lactalbumine et de lysozyme a été réalisée par diffusion de lumière dans le but d'établir le mécanisme par lequel les protéines monomériques en solution s'assemblent en objets supramoléculaires dont la morphologie dépend de la température.

La phase initiale de croissance a été caractérisée en ralentissant la réaction par diminution de la concentration en protéine totale et augmentation de la force ionique. Nous avons ainsi montré que les premières étapes du mécanisme consistent en la croissance de particules sphériques et homogènes par collision et fusion de particules plus petites et que ces étapes sont indépendantes de la température. Cette phase de croissance est donc commune aux mécanismes d'assemblages des objets supramoléculaires non-ordonnés (25°C) ou ordonnés en microsphères (45°C).

C'est la phase finale du mécanisme, observée à l'échelle microscopique, qui se distingue selon la température étudiée : des agrégats amorphes sont formés à 25°C par agrégation de particules sphériques alors que celles-ci fusionnent et se réorganisent en microsphères à 45°C. Cette réorganisation est très probablement facilitée par l'état « molten globule » de l'apo α -lactalbumine à 45°C qui est plus flexible que l'état natif de la protéine à 25°C.

L'effet propre de la température sur l'apport énergétique nécessaire à la fusion n'est pas exclu et il est difficile de distinguer cet effet de celui de l'état conformationnel de l'apo α -lactalbumine. En effet, l'augmentation de température implique également la conversion de l'apo α -lactalbumine dans son état « molten globule ».

L'importance de la flexibilité d'un des partenaires pour la formation d'objets sphériques a été appuyée par la formation de microsphères en mélangeant à pH neutre du lysozyme ou l' α -lactalbumine (apo et holo) avec des polymères de synthèse, respectivement un polyanion (acide poly-L-glutamique) ou un polycation (poly-L-lysine). Ces expériences ont été réalisées par Florine Chelet dans le cadre de son stage de licence réalisé au STLO. Cependant ces expériences ont été réalisées à 45°C et il serait intéressant de les reproduire à 25°C pour pouvoir distinguer l'effet de l'état conformationnel (flexibilité du molten globule mimé par polymères) de l'effet propre de la température.

Nous avons également montré que la dilution de particules sub-micrométriques homogènes dans un tampon équivalent à celui utilisé pour leur formation résultait en la libération en solution de protéines assemblées. Il serait intéressant d'étudier la cinétique de libération des protéines assemblées en solution par des mesures en temps réel. Nous pourrions ainsi évaluer l'état final obtenu et savoir s'il est possible de « vider » les microsphères de leur contenu et ne conserver qu'une enveloppe protéique. D'autre part, nous pourrions caractériser l'état oligomérique des protéines libérées en solution. En effet nous ne savons pas si celles-ci sont sous forme monomérique, dimérique ou d'oligomères solubles. Cette réponse pourrait également être apportée en étudiant la libération de protéines assemblées en solution par RMN après dilution de microsphères (expériences de relaxation ou de diffusion). En effet, les protéines assemblées en microsphères présentant des temps de relaxation trop rapides et un coefficient de diffusion trop lent pour être détectées, seules les protéines sous forme d'oligomères de faibles poids moléculaires seraient détectées.

D'autre part, l'étude de la réaction de désassemblage par diffusion de lumière en augmentant la force ionique ou en ajoutant du calcium pourrait également apporter des informations essentielles pour évaluer la réversibilité de l'assemblage. De plus, si la cinétique de déstabilisation est plus lente que l'assemblage, ces expériences pourraient nous permettre d'accéder à des étapes intermédiaires entre les hétérodimères et les nucléi. En effet, la phase de nucléation ne peut être caractérisée car la formation de nucléi est spontanée après mélange des deux protéines à pH 7.5. La formation des nucléi et l'évolution de leur structure interne pourraient également être étudiées en travaillant à faibles concentrations (inférieure à 0.02 mM) et/ou force ionique élevée (supérieure à 50 mM) par diffusion de rayons X aux petits angles (SAXS). En effet, cette méthode permet d'accéder à la structure interne de particules de quelques Angstrom à 100 nm (*Mertens and Svergun 2010*).

IV. Discussion générale

Les travaux présentés dans cette thèse ont été réalisés à plusieurs échelles en utilisant différentes techniques de biophysiques dans le but de caractériser les interactions et les mécanismes d'assemblage de l'apo α -lactalbumine et du lysozyme en objets supramoléculaires. Les interactions impliquées dans les premières étapes ont été caractérisées à l'échelle moléculaire par RMN et l'étape de croissance des particules sub-micrométriques a été caractérisée par diffusion de lumière. Cette partie est dédiée à la synthèse des résultats obtenus afin d'expliquer les différentes morphologies et la stabilité des objets supramoléculaires observés à l'échelle microscopique.

1. Interactions gouvernant la formation des unités élémentaires

La première étape du mécanisme d'assemblage consiste en la formation d'hétérodimères α -lactalbumine-lysozyme. L'état conformationnel de l' α -lactalbumine ne semble pas influencer son interaction avec le lysozyme puisque des hétérodimères α -lactalbumine-lysozyme sont formés aussi bien avec l'holo α -lactalbumine qui est dans sa conformation native qu'avec l'apo α -lactalbumine qui adopte une conformation molten globule à 45°C.

Nous avons montré que le rapprochement des deux protéines portant des charges opposées était gouverné par des forces électrostatiques s'exerçant à longue distance. Nous avons également montré que les hétérodimères sont des complexes transitoires, peu spécifiques et que plusieurs conformations semblent exister. En effet, l'orientation mutuelle des deux protéines dépend de la répartition des charges à leur surface : une répartition hétérogène des charges négatives à la surface de l' α -lactalbumine induit une orientation particulière du lysozyme à sa surface. Inversement, une répartition uniforme des charges positives à la surface de lysozyme résulte en une fixation peu spécifique de l' α -lactalbumine à sa surface. On peut supposer que si les deux protéines avaient présenté une répartition hétérogène des charges complémentaires à leur surface, les hétérodimères auraient présenté une plus forte stabilité et une plus haute spécificité, et seraient équivalents aux complexes protéiques permanents, tels que le complexe barnase-barnstar et certains complexes antigène-anticorps (*Gabdoulline and Wade 2001; Sinha and Smith-Gill 2002; Spaar et al. 2006*). Au contraire, une répartition uniforme des charges à la surface des deux protéines aurait augmenté davantage la non spécificité des hétérodimères.

Les hétérodimères apoLAC-LYS formés à 20°C ou 45°C sont capables de s'assembler pour former des objets supramoléculaires, contrairement aux dimères holoLAC-LYS. Les hétérodimères présentent donc une réactivité différente. En effet, bien que la surface d'interaction du lysozyme avec chacune des formes de l' α -lactalbumine soit comparable, nous avons montré que sa surface d'interaction avec l'apo α -lactalbumine se distingue par la présence d'acides aminés supplémentaires réagissant d'une manière coopérative. Le second événement de fixation ainsi mis en évidence a été attribué à la formation de tétramères qui ne peut avoir lieu que lorsque le premier événement de fixation, i.e. la formation des dimères, a débuté.

Puisque les hétérodimères composés du lysozyme et de la forme calcifiée de l' α -lactalbumine ne s'assemblent pas, nous pouvons raisonnablement postuler que ce tétramère constitue l'unité de base des objets supramoléculaires et que sa formation implique la région du site de fixation du calcium de l'apo α -lactalbumine. Des interactions électrostatiques supplémentaires peuvent alors s'établir entre les charges négatives non neutralisées de la forme décalcifiée de l' α -lactalbumine et les résidus du lysozyme impliqués dans des interactions secondaires.

2. Des tétramères à la formation de particules sub-micrométriques

Le mélange équimolaire à pH neutre des solutions d'apo α -lactalbumine et de lysozyme résulte en la formation spontanée d'agrégats. L'ajustement des conditions physico-chimiques (abaissement de la concentration ou augmentation de la force ionique), nous a permis de réduire la taille des agrégats formés initialement. Les plus petites entités observées par diffusion de lumière sont appelées nucléi.

La phase de croissance des particules sub-micrométriques à partir de ces nucléi a été caractérisée avec succès par diffusion de lumière. Ceux-ci croissent par collision et fusion et forment des particules sphériques dont la structure interne devient homogène au fur et à mesure de leur croissance par augmentation de la quantité de protéines agrégées. Ce mécanisme se distingue de ceux rapportés par Bohr et Scheibel qui décrivent la croissance de particules sphériques par addition successive de protéines monomériques ou par assemblage concentrique de feuillettes de protéines agrégées (*Bohr et al. 1997; Slotta et al. 2008*) (Paragraphe I-3.3.1.2).

Ces expériences permettent également de réviser une partie du mécanisme hypothétique proposé à partir des dépendances en concentration réalisées précédemment au laboratoire (*Nigen et al. 2010*). Les particules sub-micrométriques (nanosphères observées par microscopie optique à transmission à 40 μM de protéine totale) ne grossissent pas par agrégation en amas puis réorganisation en objets sphériques (Figure I-31) mais grossissent par coalescence après collision et fusion de nanosphères isolées.

La vitesse de croissance et l'évolution du rayon hydrodynamique de ces particules sont indépendantes de la température. Cette phase de croissance est donc commune aux mécanismes d'assemblage d'objets supramoléculaires présentant différentes morphologies à l'échelle microscopique. L'état conformationnel de l'apo α -lactalbumine ne semble donc pas influencer ces premières étapes du processus d'assemblage.

D'autre part, la taille des nucléi formés initialement n'a pas été clairement établie, mais celle-ci est certainement supérieure à celle des tétramères. Un gap persiste donc entre les tétramères et ces nucléi pour établir les premières étapes du mécanisme d'assemblage. Selon le modèle proposé pour la formation des tétramères, la majorité des charges complémentaires portées à la surface des protéines sont neutralisées pour la formation ceux-ci. Cependant l'ensemble des résidus qui ne sont pas impliqués dans les interfaces des dimères ou tétramères peuvent établir des interactions pour former ces nucléi. Ces interactions peuvent être spécifiques (α -lactalbumine-lysozyme) mais également non spécifiques (α -lactalbumine- α -lactalbumine ou lysozyme-lysozyme). Ces dernières sont probablement favorisées lorsque la taille des oligomères augmente du fait du rapprochement des protéines au sein des agrégats.

L'oligomérisation des tétramères est principalement gouvernée par des interactions hydrophobes. Ces associations hydrophobes sont d'autant plus importantes à 45°C du fait de l'exposition partielle de groupements hydrophobes à la surface de l'apo α -lactalbumine qui est dans sa conformation « molten globule » à cette température. En effet, l'expérience RMN réalisée à 45°C avec l'apo α -lactalbumine marquée semble indiquer que celle-ci reste dans son état molten globule au sein des dimères apoLAC-LYS.

Deux mécanismes sont envisageables pour la formation des nucléi (*Speed et al. 1997*): (i) un mécanisme séquentiel qui consiste en la croissance des tétramères par addition successive de protéines monomériques et (ii) un mécanisme d'agrégation multiple qui considère que deux tétramères s'assemblent pour former un octamère, qui eux même s'assemblent deux à deux, et ainsi de suite jusqu'à former les nucléi. Selon les informations obtenues à l'échelle macroscopique, telles que l'équimolarité et la répartition homogène des

protéines au sein des objets supramoléculaires, le second mécanisme semble être le plus probable.

3. Interactions impliquées dans la formation et la stabilité des objets supramoléculaires

La dernière étape du mécanisme consiste en l'organisation des particules sphériques sub-micrométriques en objets supramoléculaires de plusieurs microns et est quant à elle dépendante de la température. Les agrégats amorphes obtenus à 25°C sont constitués de particules sphériques agrégées alors que les microsphères formées à 45°C résultent de la fusion et de la réorganisation de celles-ci en objets sphériques micrométriques.

L'augmentation de la température apporte probablement une partie de l'énergie nécessaire pour surmonter la barrière thermodynamique de résistance à la fusion observée dans le cas des agrégats amorphes à 25°C. Cependant l'augmentation de la température a également un effet sur la conformation de l'apo α -lactalbumine puisqu'elle celle-ci adopte une conformation « molten globule » à 45°C. Il est par conséquent difficile de distinguer l'effet propre de la température sur l'apport énergétique permettant au système de se réorganiser de l'effet conformationnel de l'apo α -lactalbumine également dépendant de la température.

Nous pouvons postuler que la flexibilité particulière de l'état « molten globule » du fait de l'instabilité de sa structure tertiaire, favorise très probablement la coalescence des particules sphériques (*Gauer et al. 2010*). L'exposition partielle des groupements hydrophobes à la surface du « molten globule » de l'apo α -lactalbumine favorise également la fusion des particules sub-micrométriques en microsphères et la réorganisation des protéines pour favoriser des associations hydrophobes spécifiques (entre apo α -lactalbumine et lysozyme) et également non spécifiques (entre deux molécules d'apo α -lactalbumine). L'agrégation aléatoire des particules sphériques sub-micrométriques à une température inférieure à la température de dénaturation de l'apo α -lactalbumine, seraient également gouvernée par des interactions hydrophobes. Cependant, à 45°C, l'exposition partielle de groupements hydrophobes initialement enfouis au cœur de la protéine tend probablement à augmenter l'hétérogénéité de la réparation des patches hydrophobes à la surface de l'apo α -lactalbumine, favorisant ainsi les interactions hydrophobes (*Jonsson et al. 2003*). Le fait que la déstabilisation des microsphères ne soit pas complète par augmentation de la force

ionique (*Nigen et al. 2009*) est également en faveur de l'implication d'interactions hydrophobes dans la stabilisation des microsphères.

L'état conformationnel de l'apo α -lactalbumine joue donc un rôle essentiel dans cette dernière étape du mécanisme et serait le facteur déterminant pour l'apparence d'ordre dans ces objets micrométriques.

Selon les résultats obtenus par spectroscopie infrarouge, la formation des microsphères n'implique pas de changements drastiques de structure secondaire des protéines. Cette conclusion est en accord avec les résultats obtenus par RMN qui ont montré que la formation des dimères n'engendrait pas de réarrangement conformationnel des protéines. En effet des changements de structure secondaire se traduiraient par des modifications sur l'ensemble des spectres RMN. Cependant la formation de feuillets β non natifs au sein des microsphères n'est pas exclue puisque qu'un léger signal a été observé par spectroscopie infrarouge. Celui-ci pourrait résulter de la formation de feuillets β entre molécules d'apo α -lactalbumine. Cependant, la proportion de feuillets β intermoléculaires éventuellement formés est probablement négligeable par rapport à la proportion des feuillets β natifs. En effet, il est important de souligner que le lysozyme est dans sa conformation native dans les conditions favorables à la formation des microsphères. La formation de feuillets non natifs entre les molécules de lysozyme et entre le lysozyme et l'apo α -lactalbumine n'est donc pas favorisée. Enfin, la présence du lysozyme diminue également les interactions non spécifiques entre molécules d'apo α -lactalbumine.

4. Stabilité des microsphères

Nous avons également mis en évidence une libération en solution de protéines assemblées après dilution des microsphères. Or il a été montré que les fibres amyloïdes qui impliquent une « condensation » des protéines par établissement de feuillets β intermoléculaires sont relativement stables à la dilution (*Veerman et al. 2003*). L'absence de réarrangements structuraux importants entre le lysozyme et l'apo α -lactalbumine peut donc expliquer la faible stabilité des microsphères à la dilution.

Il est difficile de savoir sous quelle forme sont les protéines dites en solution ; celles-ci peuvent être monomériques, sous forme de dimères, de tétramères ou d'oligomères solubles. En effet une fois les microsphères formées par agrégation multiples de tétramères, il est tout à

fait possible que les tétramères soient les unités élémentaires relarguées en solutions par dilution. Une fois en solution ils peuvent également constituer les unités qui s'échangent avec les protéines assemblées.

Enfin, la stabilité des protéines assemblées semble différente selon leur localisation dans les microsphères ; les protéines en périphérie semblent plus stables que les protéines contenues à l'intérieure. Ces dernières peuvent être libérées en solution après dilution. En effet, les expériences de diffusion de lumières ont montré une diminution de l'intensité diffusée après dilution alors que le rayon hydrodynamique des particules sub-micrométriques était constant, et les expériences de déstabilisation des microsphères par ajout de CaCl_2 semblent indiquer qu'une couronne de protéines est conservée malgré une diminution de la densité interne des objets. L'environnement des protéines en périphérie des microsphères est différent de celui des protéines au cœur de ces objets. En effet, les protéines en surface des microsphères sont en interaction avec le solvant et sont également impliquées dans le maintien de la tension de surface propre à ces objets sphériques. Ces deux éléments exercent probablement des contraintes particulières sur les protéines en surface. Elles présentent donc un degré de liberté moindre en comparaison des protéines au cœur des microsphères qui elles sont dans un microenvironnement homogène.

V. Conclusions & Perspectives d'applications

Les travaux réalisés durant ma thèse présentent une approche qui peut être transposée à l'étude d'autres systèmes protéiques binaires menant à la formation d'objets supramoléculaires. Le mécanisme d'assemblage a été établi en caractérisant celui-ci à différentes échelles à l'aide de méthodes de biophysique complémentaires. L'approche mise en œuvre a consisté à (i) identifier des acides aminés impliqués dans l'interface des hétérodimères apo α -lactalbumine-lysozyme et à caractériser les tétramères qui constituent l'unité élémentaire des objets supramoléculaires, (ii) à évaluer l'arrangement des protéines au sein des objets macroscopiques et (iii) à caractériser les états intermédiaires du mécanisme en ralentissant la réaction d'assemblage. Les résultats obtenus ont apporté des informations essentielles pour comprendre les forces gouvernant la formation d'objets supramoléculaires ordonnés par assemblage de deux protéines globulaires de charges opposées. Les travaux réalisés ont également apporté des éléments nouveaux pour la compréhension de la stabilité des objets formés et leur réversibilité.

L'ensemble des résultats acquis nous a permis d'affiner et de compléter le mécanisme d'assemblage proposé au début de ces travaux. Le processus d'assemblage proposé à ce jour est synthétisé dans le schéma ci-dessous (Figure V-1). La reconnaissance moléculaire et la formation des dimères apo α -lactalbumine-lysozyme sont gouvernées par des attractions électrostatiques. Ces hétérodimères s'associent en tétramères par neutralisation des charges portées par l'apo α -lactalbumine au niveau du site de fixation du calcium. Les étapes suivantes sont principalement gouvernées par des associations hydrophobes spécifiques et non spécifiques. Les particules croissent par collision et fusion de petites particules jusqu'à former des particules sub-micrométriques de taille critique. Cette étape de croissance est commune aux mécanismes d'assemblage quelque soit la température. Enfin, lorsque les protéines sont incubées à 25°C, les particules sub-micrométriques s'agrègent pour former des amas non ordonnés selon des interactions hydrophobes. Si la température est supérieure à la température de dénaturation de l'apo α -lactalbumine, ces particules sub-micrométriques coalescent et les protéines se réorganisent en microsphères. Cette dernière étape met en jeu la flexibilité particulière de l'apo α -lactalbumine à 45°C et des interactions hydrophobes supplémentaires. Une fois formées, les microsphères sont en équilibre dynamique avec les protéines non assemblées. Un échange est possible puisque les protéines assemblées présentent un certain degré de liberté car elles ne sont pas contraintes à l'intérieur des microsphères par des réarrangements structuraux importants.

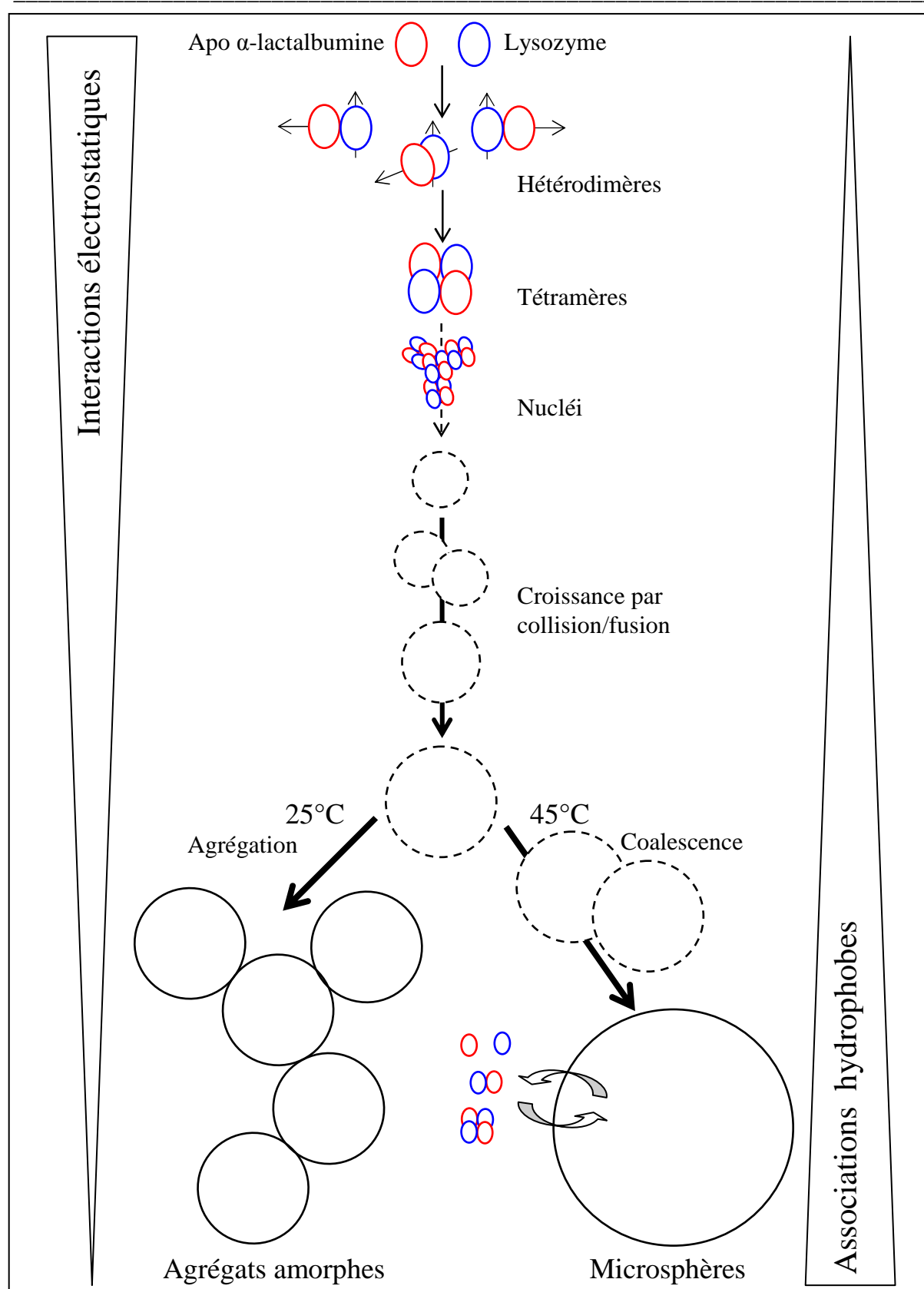


Figure V-1 : Processus d'assemblage de l'apo α -lactalbumine et du lysozyme. La reconnaissance moléculaire et la formation des tétramères mettent en jeu des interactions électrostatiques attractives alors que les dernières étapes du mécanisme sont principalement gouvernées par des interactions hydrophobes. La coalescence des particules est favorisée à 45°C par la flexibilité du « molten globule » de l'apo α -lactalbumine.

Il s'agit à présent d'utiliser l'ensemble des données collectées sur ce système binaire pour envisager des applications à ces objets supramoléculaires. Voici quelques propositions d'applications potentielles des microsphères, illustrées en Figure V-2.

Les microsphères pourraient être utilisées comme vecteur de molécules d'intérêt, telles que des peptides bioactifs, des acides aminés essentiels, des arômes ou des vitamines, pour protéger celles-ci contre leur dégradation ou les transporter et les délivrer dans des conditions définies. La nature chimique de la molécule d'intérêt peut être variée (hydrophile, hydrophobe, chargé, neutre) tout en restant de taille inférieure aux protéines pour ne pas provoquer de gêne stérique trop importante. En effet, la formation et la stabilité des microsphères étant gouvernées par une balance fine de forces de faible énergie, la nature chimique de la molécule est certainement décisive pour son incorporation et son maintien à l'intérieur des objets.

Le Figure V-2A illustre les différentes méthodes proposées pour incorporer une molécule dans les microsphères. Dans un premier temps, il serait intéressant de tester la composition des objets supramoléculaires résultant de l'incubation à 45°C d'un mélange de protéines contenant la molécule d'intérêt (Figure V-2A1). Si la présence de la molécule testée dans le milieu empêche la formation des microsphères ou que celle-ci n'est pas incluse dans les objets, il est également envisageable de former les microsphères puis d'ajouter la molécule au milieu à température ambiante ou inférieure (Figure V-2A2), en faisant l'hypothèse que son incorporation dans les microsphères serait favorisée par un gradient de concentration. Cette seconde alternative est également adaptée pour des molécules sensibles à la température, telles que les vitamines. Enfin, nous pouvons également envisager d'utiliser la déstabilisation partielle des microsphères par addition de CaCl_2 ou augmentation de la force ionique pour les « vider » partiellement de leur contenu protéique. Il s'agirait d'ajuster les conditions pour conserver une enveloppe de protéine suffisamment épaisse et solide avant d'ajouter une molécule hydrophile qui serait encapsulée dans le cœur aqueux des microsphères (Figure V-2A3). Quelque soit la méthode envisagée il est nécessaire de doser la proportion de molécule encapsulée et de tester son maintien à l'intérieur des microsphères au cours du temps.

La libération de la molécule encapsulée pourrait être contrôlée soit par diffusion (libération lente) en plaçant les microsphères dans un milieu ne contenant pas cette molécule ou en utilisant la réversibilité des microsphères en milieu acide ou à force ionique relativement élevée (libération rapide). Outre la valeur nutritionnelle des protéines, leur

libération combinée peut également être fonctionnelle pour supplémenter le milieu en lysozyme qui est un agent antibactérien et en α -lactalbumine pour la bioactivité des peptides issus de sa digestion.

D'autre part, afin de stabiliser les microsphères, c'est-à-dire empêcher l'échange entre protéines assemblées et protéines en solution, il est également envisageable d'enrober les microsphères avec un polymère (Figure V-2B), tel qu'un polysaccharide en utilisant la réaction de Maillard. La couche externe ainsi formée peut également servir de barrière pour empêcher la libération de la molécule encapsulée. Il est alors nécessaire d'établir les conditions optimales, i.e. le couple (temps, température) pour réaliser cette réaction de conjugaison. Il faut s'assurer que l'incubation à température élevée ($\geq 80^{\circ}\text{C}$) n'engendre pas la coalescence des microsphères. Il est possible que la présence d'un polymère dans le milieu empêche cette fusion par stabilisation de la tension de surface. D'autre part, le polysaccharide peut également servir d'agent protecteur lors de la lyophilisation des microsphères. Il est donc également envisageable de réaliser la réaction de Maillard en contrôlant l'activité aqueuse afin de réduire le couple (temps, température) pour conjuguer protéines et polysaccharides. Pour vérifier la formation d'une couche externe de polysaccharide autour des microsphères, des observations par microscopie confocale à balayage laser sont envisageables en utilisant un polysaccharide couplé à une sonde fluorescente. Le traitement de lyophilisation, une fois optimisé, permettrait de conserver les microsphères sous forme de poudre et de faciliter leur utilisation comme ingrédient fonctionnel. L'addition d'un polysaccharide ajouterait également un pouvoir sucrant aux microsphères. Ainsi leur incorporation dans un produit alimentaire comme vecteur de molécule bioactive, libérée après hydrolyse de l'enveloppe glucidique sous l'action des enzymes salivaires, pourrait être avantageuse. D'autre part, le contrôle de la taille de ces objets en modulant la concentration et la force ionique du milieu lors de leur formation peut également s'avérer utile pour créer des objets nanométriques et moduler les propriétés texturantes des microsphères. En effet si on envisage d'incorporer ces microsphères dans un aliment ou un produit cosmétique par exemple, une granulométrie fine favorise une perception agréable (gustative et tactile).

Enfin, la fonctionnalisation de la surface des microsphères est également envisageable (Figure V-2C). En effet, les microsphères pourraient être utilisées comme support pour greffer des molécules présentant une spécificité particulière, telle que des anticorps ou une enzyme. Ainsi, les microsphères pourraient ainsi être utilisées pour réaliser des tests *in vitro*, tels que la

détection de molécules reconnues par l'anticorps ou converties par l'enzyme. Connaissant les acides aminés impliqués dans la formation des unités élémentaires des microsphères, la réticulation d'une des protéines avec une molécule d'intérêt (Figure V-2C1), un anticorps par exemple, peut être effectuée en ciblant les acides aminés qui ne sont pas localisés dans l'interface des dimères. Cependant, cette méthode suppose que la modification de la protéine n'empêche pas son assemblage, ce qui est peu probable. Une approche alternative serait de conjuguer cette molécule au polymère utilisé pour enrober les microsphères (Figure V-2C2).

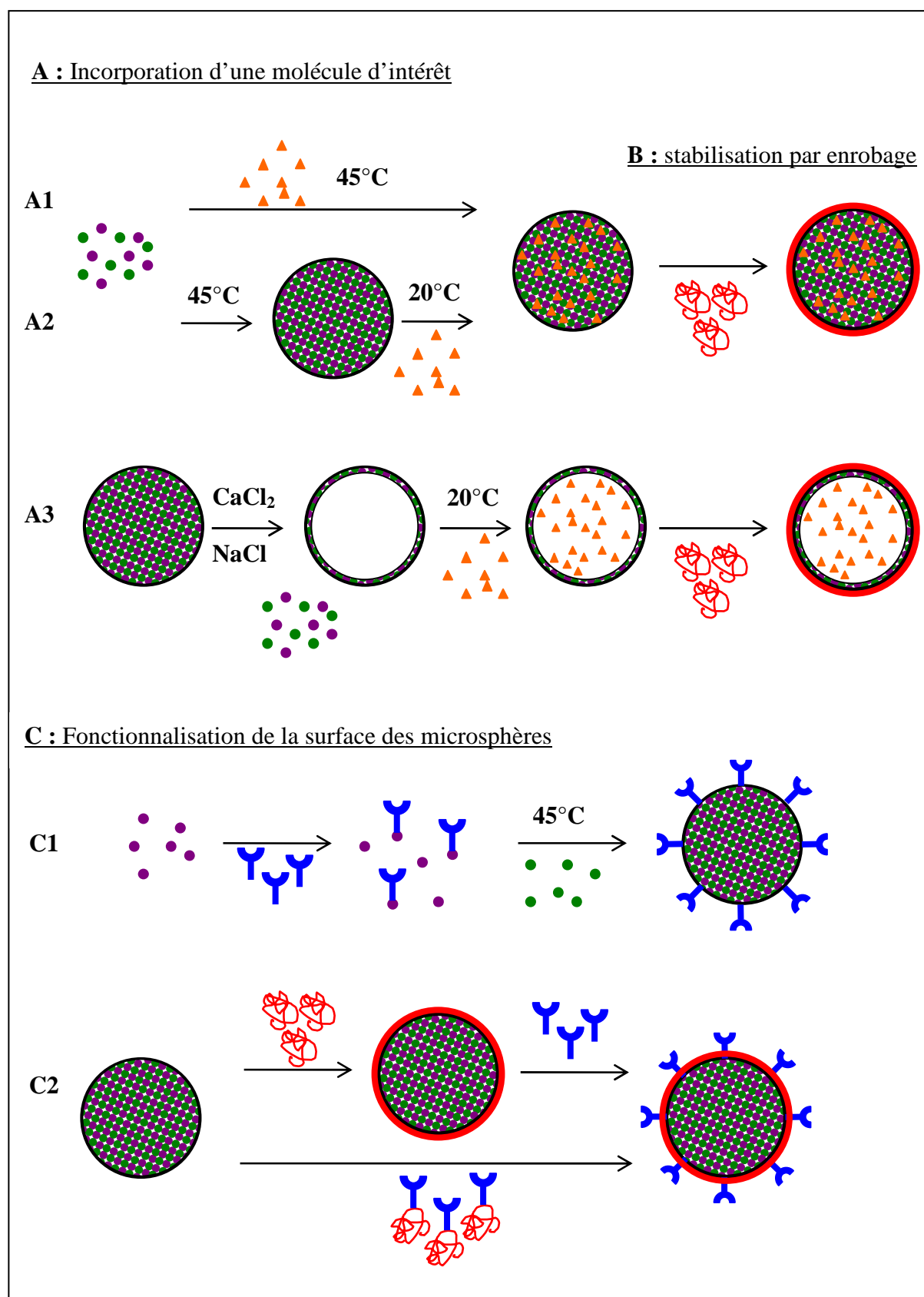


Figure V-2 : Illustration des applications potentielles des microsphères et des méthodes à tester pour utiliser les microsphères comme vecteur de molécule d'intérêt (A), les stabiliser (B) et fonctionnaliser leur surface (C).

Références bibliographiques

A

- Acharya, K. R., D. I. Stuart, et al. (1994). "Models of the three-dimensional structures of echidna, horse, and pigeon lysozymes: Calcium-binding lysozymes and their relationship with α -lactalbumins." *Journal of Protein Chemistry* **13**(6): 569-584.
- Akbarinia, A., M. Abdolzadeh, et al. (2011). "Critical investigation of heat transfer enhancement using nanofluids in microchannels with slip and non-slip flow regimes." *Applied Thermal Engineering* **31**(4): 556-565.
- Akerud, T., E. Thulin, et al. (2002). "Intramolecular dynamics of low molecular weight protein tyrosine phosphatase in monomer-dimer equilibrium studied by NMR: A model for changes in dynamics upon target binding." *Journal of Molecular Biology* **322**(1): 137-152.
- Alexandrescu, A. T., P. A. Evans, et al. (1993). "Structure and dynamics of the acid-denatured molten globule state of alpha-lactalbumin: a 2-dimensional NMR study " *Biochemistry* **32**(7): 1707-1718.
- Anfinsen, C. and E. Haber (1961). "Studies on reduction and re-formation of protein disulfide bonds." *Journal of Biological Chemistry* **236**(5): 1361-&.
- Anfinsen, C. B. (1973). "Principles that govern folding of protein chains " *Science* **181**(4096): 223-230.
- Aytuna, A. S., A. Gursoy, et al. (2005). "Prediction of protein-protein interactions by combining structure and sequence conservation in protein interfaces." *Bioinformatics* **21**(12): 2850-2855.

B

- Bai, Y. W., J. S. Milne, et al. (1993). "Primary structure effects on peptide group hydrogen-exchange " *Proteins-Structure Function and Genetics* **17**(1): 75-86.
- Balbach, J., V. Forge, et al. (1997). "Detection of residue contacts in a protein folding intermediate." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**(14): 7182-7185.
- Baussay, K., D. Durand, et al. (2006). "Coupling between polysaccharide gelation and micro-phase separation of globular protein clusters." *Journal of Colloid and Interface Science* **304**(2): 335-341.
- Biesheuvel, M., S. Lindhoud, et al. (2006). "Phase behavior of mixtures of oppositely charged protein nanoparticles at asymmetric charge ratios." *Physical Review E (Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics)* **73**(4): 041408.
- Biesheuvel, P. M., S. Lindhoud, et al. (2006). "Phase behavior of mixtures of oppositely charged nanoparticles: Heterogeneous Poisson-Boltzmann cell model applied to lysozyme and succinylated lysozyme." *Langmuir* **22**(3): 1291-1300.
- Bogan, A. A. and K. S. Thorn (1998). "Anatomy of hot spots in protein interfaces." *Journal of Molecular Biology* **280**(1): 1-9.
- Bohr, H., A. Kuhle, et al. (1997). "Hierarchical organization in aggregates of protein molecules." *Zeitschrift Fur Physik D-Atoms Molecules and Clusters* **40**(1-4): 513-515.
- Bolder, S. G., H. Hendrickx, et al. (2006). "Fibril assemblies in aqueous whey protein mixtures." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**(12): 4229-4234.
- Bolder, S. G., L. M. C. Sagis, et al. (2007). "Effect of stirring and seeding on whey protein fibril formation." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**(14): 5661-5669.

- Bonnet, F., R. Schweins, et al. (2008). "Suppression of aggregation in natural-semiflexible/flexible polyanion mixtures, and direct check of the OSF model using SANS." *Europhysics Letters* **48002** (48006 pp.).
- Bromley, E. H. C., M. R. H. Krebs, et al. (2005). "Aggregation across the length-scales in beta-lactoglobulin." *Faraday Discussions* **128**: 13-27.
- Bryant, R. G. (1983). "The NMR time scale." *Journal of Chemical Education* **60**(11): 933-935.
- Bryngelson, J. D., J. N. Onuchic, et al. (1995). "Funnels, pathways and the energy landscape of protein-folding: a synthesis " *Proteins-Structure Function and Genetics* **21**(3): 167-195.
- Buck, M., J. Boyd, et al. (1995). "Structural determinants of protein dynamics: analysis of N¹⁵ NMR relaxation measurements for main-chain and side-chain nuclei of hen egg-white lysozyme " *Biochemistry* **34**(12): 4041-4055.
- Bushmarina, N. A., C. Blanchet, et al. (2005). "Folding of proteins: the example of the alpha-lactalbumine." *Journal De Physique Iv* **130**: 209-228.
- Bushmarina, N. A., C. E. Blanchet, et al. (2006). "Cofactor effects on the protein folding reaction: Acceleration of alpha-lactalbumin refolding by metal ions." *Protein Science* **15**(4): 659-671.

C

- Camacho, C. J., Z. Weng, et al. (1999). "Free Energy Landscapes of Encounter Complexes in Protein-Protein Association." *Biophysical Journal* **76**(3): 1166-1178.
- Carlier, M. F., C. Le Clainche, et al. (2003). "Actin-based motility: from molecules to movement." *Bioessays* **25**(4): 336-345.
- Caussin, F., M. H. Famelart, et al. (2003). "Mineral modulation of thermal aggregation and gelation of whey proteins: from beta-lactoglobulin model system to whey protein isolate." *Lait* **83**(5): 1-12.
- Chen, Y., J. Reizer, et al. (1993). "Mapping of the binding interfaces of the proteins of the bacterial phosphotransferase system, HPr and IIA-Glu." *Biochemistry* **32**(1): 32-37.
- Chenal, A., G. Vernier, et al. (2005). "Conformational states and thermodynamics of alpha-lactalbumin bound to membranes: A case study of the effects of pH, calcium, lipid membrane curvature and charge." *Journal of Molecular Biology* **349**(4): 890-905.
- Chiti, F. and C. M. Dobson (2006). "Protein misfolding, functional amyloid, and human disease." *Annual Review of Biochemistry* **75**: 333-366.
- Chothia, C., T. Hubbard, et al. (1997). "Protein folds in the all-beta and all-alpha classes." *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **26**: 597-627.
- Christensen, H. and R. H. Pain (1991). "Molten globule intermediates and protein folding." *European Biophysics Journal* **19**(5): 221-229.
- Chrysina, E. D., K. Brew, et al. (2000). "Crystal structures of apo- and holo-bovine alpha-lactalbumin at 2.2-A resolution reveal an effect of calcium on inter-lobe interactions." *Journal of Biological Chemistry* **275**(47): 37021-37029.
- Chung, E. W., E. J. Nettleton, et al. (1997). "Hydrogen exchange properties of proteins in native and denatured states monitored by mass spectrometry and NMR." *Protein Science* **6**(6): 1316-1324.
- Clark, E. D. B. (1998). "Refolding of recombinant proteins." *Current Opinion in Biotechnology* **9**(2): 157-163.
- Clarkson, J. and I. D. Campbell (2003). "Studies of protein-ligand interactions by NMR." *Biochemical Society Transactions* **31**: 1006-1009.

- Clore, G. M. and A. M. Gronenborn (1998). "NMR structure determination of proteins and protein complexes larger than 20 kDa." Current Opinion in Chemical Biology **2**(5): 564-570.
- Conde, C. and A. Caceres (2009). "Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites." Nature Reviews Neuroscience **10**(5): 319-332.
- Cooper, C. L., P. L. Dubin, et al. (2005). "Polyelectrolyte-protein complexes." Current Opinion in Colloid & Interface Science **10**(1-2): 52-78.
- Creighton, T. E. (1978). "Experimentale studies of protein folding and unfolding " Progress in Biophysics & Molecular Biology **33**(3): 231-297.
- Croguennoc, P., D. Durand, et al. (2001). "Phase separation and association of globular protein aggregates in the presence of polysaccharides: 1. Mixtures of preheated beta-lactoglobulin and k-carrageenan at room temperature." Langmuir **17**(14): 4372-4379.
- Croguennoc, P., T. Nicolai, et al. (2001). "Phase separation and association of globular protein aggregates in the presence of polysaccharides: 2. Heated mixtures of native beta-Lactoglobulin and k-Carrageenan." Langmuir **17**(14): 4380-4385.
- Curtis, R. A., J. Ulrich, et al. (2002). "Protein-protein interactions in concentrated electrolyte solutions - Hofmeister-series effects." Biotechnology and Bioengineering **79**(4): 367-380.

D

- de Kruif, C. G. and R. Tuinier (2001). "Polysaccharide protein interactions." Food Hydrocolloids **15**(4-6): 555-563.
- de Vries, R. (2004). "Monte Carlo simulations of flexible polyanions complexing with whey proteins at their isoelectric point." Journal of Chemical Physics **120**(7): 3475-3481.
- Desfougères, Y., T. Croguennec, et al. (2010). "Charge and Size Drive Spontaneous Self-Assembly of Oppositely Charged Globular Proteins into Microspheres." The Journal of Physical Chemistry B **114**(12): 4138-4144.
- Dill, K. A. (1990). "Dominant forces in protein folding " Biochemistry **29**(31): 7133-7155.
- Dingley, A. J., J. P. Mackay, et al. (1995). "Measuring protein self-association using pulsed-field-gradient NMR spectroscopy: Application to myosin light chain 2." Journal of Biomolecular Nmr **6**(3): 321-328.
- Dobson, C. M. (1999). "Protein misfolding, evolution and disease." Trends in Biochemical Sciences **24**(9): 329-332.
- Dobson, C. M. (2003). "Protein folding and misfolding." Nature **426**(6968): 884-890.
- Dolgikh, D. A., L. V. Abaturv, et al. (1985). "Compact state of a protein molecule with pronounced small-scale mobility: bovine α -lactalbumin." European Biophysics Journal **13**(2): 109-121.
- Dolgikh, D. A., R. I. Gilmanishin, et al. (1981). "Alpha-lactalbumin: compact state with fluctuating tertiary structure " Febs Letters **136**(2): 311-315.
- Dolgikh, D. A., A. P. Kolomiets, et al. (1984). "'Molten-globule" state accumulates in carbonic anhydrase folding." FEBS Letters **165**(1): 88-92.
- Dominguez, C., R. Boelens, et al. (2003). "HADDOCK: A protein-protein docking approach based on biochemical or biophysical information." Journal of the American Chemical Society **125**(7): 1731-1737.

E

- Elcock, A. H., D. Sept, et al. (2001). "Computer Simulation of Protein-Protein Interactions." The Journal of Physical Chemistry B **105**(8): 1504-1518.
- Engen, J. R. and D. L. Smith (2000). "Investigating the higher order structure of proteins - Hydrogen exchange, proteolytic fragmentation, and mass spectrometry." Mass Spectrometry of Proteins and Peptides **146**: 95-112.
- Englander, S. W. (2000). "Protein folding intermediates and pathways studied by hydrogen exchange." Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure **29**: 213-238.
- Englander, S. W. (2006). "Hydrogen Exchange and Mass Spectrometry: A Historical Perspective." Journal of the American Society for Mass Spectrometry **17**(11): 1481-1489.

F

- Fielding, L. (2007). "NMR methods for the determination of protein-ligand dissociation constants." Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy **51**(4): 219-242.
- Fink, A. L. (1998). "Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid." Folding and Design **3**(1): R9-R23.
- Fink, A. L., L. J. Calciano, et al. (1994). "Classification of acid denaturation of proteins: intermediates and unfolded states." Biochemistry **33**(41): 12504-12511.
- Fink, A. L., K. A. Oberg, et al. (1998). "Discrete intermediates versus molten globule models for protein folding: characterization of partially folded intermediates of apomyoglobin." Folding and Design **3**(1): 19-25.
- Forge, V., E. Mintz, et al. (1993). "Ca²⁺ binding to sarcoplasmic reticulum ATPase revisited. I. Mechanism of affinity and cooperativity modulation by H⁺ and Mg²⁺." Journal of Biological Chemistry **268**(15): 10953-10960.
- Forge, V., R. T. Wijesinha, et al. (1999). "Rapid collapse and slow structural reorganisation during the refolding of bovine alpha-lactalbumin." Journal of Molecular Biology **288**(4): 673-688.
- Fraenkelconrat, H. and R. C. Williams (1955). "Reconstitution of active Tobacco Mosaic Virus from its inactive protein and nucleic acid components " Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **41**(10): 690-698.
- Frare, E., M. F. Mossuto, et al. (2006). "Identification of the Core Structure of Lysozyme Amyloid Fibrils by Proteolysis." Journal of Molecular Biology **361**(3): 551-561.
- Frare, E., P. Polverino de Laureto, et al. (2004). "A Highly Amyloidogenic Region of Hen Lysozyme." Journal of Molecular Biology **340**(5): 1153-1165.
- Friess, W. (1998). "Collagen - biomaterial for drug delivery." European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics **45**(2): 113-136.

G

- Gabdoulline, R. R. and R. C. Wade (2001). "Protein-protein association: Investigation of factors influencing association rates by Brownian dynamics simulations." Journal of Molecular Biology **306**(5): 1139-1155.
- Garrett, D. S., Y. J. Seok, et al. (1997). "Identification by NMR of the binding surface for the histidine-containing phosphocarrier protein HPr on the N-terminal domain of enzyme I of the Escherichia coli phosphotransferase system." Biochemistry **36**(15): 4393-4398.
- Gauer, C., H. Wu, et al. (2010). "Coalescence Control of Elastomer Clusters by Fixed Surface Charges." Journal of Physical Chemistry B **114**(4): 1562-1567.

- Gazit, E. (2007). "Self-assembled peptide nanostructures: the design of molecular building blocks and their technological utilization." Chemical Society Reviews **36**(8): 1263-1269.
- Goda, S., K. Takano, et al. (2000). "Amyloid protofilament formation of hen egg lysozyme in highly concentrated ethanol solution." Protein Science **9**(2): 369-375.
- Goers, J., S. E. Permyakov, et al. (2002). "Conformational prerequisites for alpha-lactalbumin fibrillation." Biochemistry **41**(41): 12546-12551.
- Graveland-Bikker, J. F. and C. G. de Kruif (2006). "Unique milk protein based nanotubes: Food and nanotechnology meet." Trends in Food Science & Technology **17**(5): 196-203.
- Graveland-Bikker, J. F., G. Fritz, et al. (2006). "Growth and structure of [alpha]-lactalbumin nanotubes." Journal of Applied Crystallography **39**(2): 180-184.
- Graveland-Bikker, J. F., R. Ipsen, et al. (2004). "Influence of calcium on the self-assembly of partially hydrolyzed alpha-lactalbumin." Langmuir **20**(16): 6841-6846.
- Griko, Y. V., E. Freire, et al. (1994). "Energetics of the alpha-Lactalbumin States: A Calorimetric and Statistical Thermodynamic Study." Biochemistry **33**(7): 1889-1899.
- Griko, Y. V. and D. P. Remeta (1999). "Energetics of solvent and ligand-induced conformational changes in alpha-lactalbumin." Protein Science **8**(3): 554-561.
- Grobler, J. A., M. Wang, et al. (1994). "Study by mutagenesis of the roles of 2 aromatic clusters of alpha-lactalbumin in aspects of its action in the lactose synthase system " Journal of Biological Chemistry **269**(7): 5106-5114.

H

- Håkansson, A., B. Zhivotovsky, et al. (1995). "Apoptosis induced by a human milk protein." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **92**(17): 8064-8068.
- Hardy, J. G., L. M. Römer, et al. (2008). "Polymeric materials based on silk proteins." Polymer **49**(20): 4309-4327.
- Harrison, S. C. and R. Durbin (1985). "Is there a single pathway for the folding of a polypeptide chain? ." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **82**(12): 4028-4030.
- Hendrix, T., Y. V. Griko, et al. (2000). "A calorimetric study of the influence of calcium on the stability of bovine alpha-lactalbumin." Biophysical Chemistry **84**(1): 27-34.
- Holley, M., C. Eginton, et al. (2008). "Characterization of amyloidogenesis of hen egg lysozyme in concentrated ethanol solution." Biochemical and Biophysical Research Communications **373**(1): 164-168.
- Howell, N. and E. LiChan (1996). "Elucidation of interactions of lysozyme with whey proteins by Raman spectroscopy." International Journal of Food Science and Technology **31**(5): 439-451.
- Howell, N. K., N. A. Yeboah, et al. (1995). "Studies on the electrostatic interactions of lysozyme with alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin." International Journal of Food Science and Technology **30**(6): 813-824.
- Hu, J. H., S. Y. Yu, et al. (2007). "Stable amphoteric nanogels made of ovalbumin and ovotransferrin via self-assembly." Langmuir **23**(11): 6358-6364.
- Huemmerich, D., U. Slotta, et al. (2006). "Processing and modification of films made from recombinant spider silk proteins." Applied Physics A: Materials Science & Processing **82**(2): 219-222.

I-J

- Ipsen, R. and J. Otte (2007). "Self-assembly of partially hydrolysed alpha-lactalbumin." Biotechnology Advances **25**: 602-605.
- Johnson, B. A. and R. A. Blevins (1994). "NMRView: a computer program for the visualization and analysis of NMR data." Journal of Biomolecular Nmr **4**(5): 603-614.
- Jones, O. G. and D. J. McClements (2010). "Functional Biopolymer Particles: Design, Fabrication, and Applications." Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety **9**(4): 374-397.
- Jones, S. and J. M. Thornton (1997). "Analysis of protein-protein interaction sites using surface patches." Journal of Molecular Biology **272**(1): 121-132.
- Jonsson, M., M. Skepo, et al. (2003). "Effect of spatially distributed hydrophobic surface residues on protein-polymer association." Journal of Physical Chemistry B **107**(23): 5511-5518.

K

- Kamau, S. M., S. C. Cheison, et al. (2010). "Alpha-Lactalbumin: Its Production Technologies and Bioactive Peptides." Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety **9**(2): 197-212.
- Kasai, S., Y. Ohga, et al. (2004). "Multifunctional peptide fibrils for biomedical materials." Biopolymers **76**(1): 27-33.
- Kasotakis, E., E. Mossou, et al. (2009). "Design of Metal-Binding Sites Onto Self-Assembled Peptide Fibrils." Biopolymers **92**(3): 164-172.
- Kataoka, M., F. Tokunaga, et al. (1997). "Structural characterization of the molten globule of α -lactalbumin by solution X-ray scattering." Protein Science **6**(2): 422-430.
- Kelly, J. W. (1998). "The alternative conformations of amyloidogenic proteins and their multi-step assembly pathways." Current Opinion in Structural Biology **8**(1): 101-106.
- Keskin, O., A. Gursoy, et al. (2008). "Principles of protein-protein interactions: what are the preferred ways for proteins to interact?" Chem Rev **108**(4): 1225-1244.
- Kozack, R. E., M. J. Dmello, et al. (1995). "Computer modeling of electrostatic steering and orientational effects in antibody-antigen association " Biophysical Journal **68**(3): 807-814.
- Krebs, M. R. H., E. H. C. Bromley, et al. (2005). "The binding of thioflavin-T to amyloid fibrils: localisation and implications." Journal of Structural Biology **149**(1): 30-37.
- Krebs, M. R. H., G. L. Devlin, et al. (2007). "Protein particulates: Another generic form of protein aggregation?" Biophysical Journal **92**(4): 1336-1342.
- Krebs, M. R. H., C. E. MacPhee, et al. (2004). "The formation of spherulites by amyloid fibrils of bovine insulin." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **101**(40): 14420-14424.
- Krebs, M. R. H., D. K. Wilkins, et al. (2000). "Formation and seeding of amyloid fibrils from wild-type hen lysozyme and a peptide fragment from the [beta]-domain." Journal of Molecular Biology **300**(3): 541-549.
- Kresheck, G. C., Schneide, H., et al. (1965). "Effect of D₂O on thermal stability of proteins: Thermodynamic parameters for transfer of model compounds from H₂O to D₂O." Journal of Physical Chemistry **69**(9): 3132-&.
- Kronman, M. J., S. K. Sinha, et al. (1981). "Characteristics of the binding of Ca²⁺ and other divalent metal-ions to bovine alpha-lactalbumin " Journal of Biological Chemistry **256**(16): 8582-8587.
- Kuwajima, K. (1996). "The molten globule state of alpha-lactalbumin." Faseb Journal **10**(1): 102-109.

- Kuwajima, K., K. Nitta, et al. (1976). "3-state denaturation of alpha-lactalbumin by guanidine-hydrochloride." Journal of Molecular Biology **106**(2): 359-373.
- Kuznetsova, I. M., S. Y. Khaitlina, et al. (1988). "Changes of structure and intramolecular mobility in the course of actin denaturation " Biophysical Chemistry **32**(1): 73-78.
- Kwan, A. H., M. Mobli, et al. (2011). "Macromolecular NMR spectroscopy for the nonspectroscopist." FEBS Journal: no-no.

L

- Lammel, A., M. Schwab, et al. (2011). "Recombinant spider silk particles as drug delivery vehicles." Biomaterials **32**(8): 2233-2240.
- Lammel, A., M. Schwab, et al. (2008). "Processing Conditions for the Formation of Spider Silk Microspheres." ChemSusChem **1**(5): 413-416.
- Lepre, C. A., J. M. Moore, et al. (2004). "Theory and applications of NMR-based screening in pharmaceutical research." Chemical Reviews **104**(8): 3641-3675.
- Levinthal (1968). "Are there pathways for protein folding?" J. Chem. Phys. **65**: 44-45.
- Levitt, M. and C. Chothia (1976). "Structural patterns in globular proteins " Nature **261**(5561): 552-558.
- Li, T., Z. W. Niu, et al. (2008). "Core/Shell Biocomposites from the Hierarchical Assembly of Bionanoparticles and Polymer." Small **4**(10): 1624-1629.
- Lin, M. Y., H. M. Lindsay, et al. (1989). "Universality in colloid aggregation " Nature **339**(6223): 360-362.
- Lisřková, K., A. L. Kelly, et al. (2010). "Effect of Denaturation of α -Lactalbumin on the Formation of BAMLET (Bovine α -Lactalbumin Made Lethal to Tumor Cells)." Journal of Agricultural and Food Chemistry **58**(7): 4421-4427.
- Liu, J., J. D. Farmer, et al. (1991). "Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporine A and FKBP-FK506 complexes " Cell **66**(4): 807-815.
- Livney, Y. D. (2010). "Milk proteins as vehicles for bioactives." Current Opinion in Colloid & Interface Science **15**(1-2): 73-83.
- London, J., C. Skrzynia, et al. (1974). "Renaturation of Escherichia Coli tryptophanase after exposure to 8M urea. Evidence for existence of nucleation centers. ." European Journal of Biochemistry **47**(2): 409-415.
- Loveday, S. M., M. A. Rao, et al. (2009). "Factors Affecting Rheological Characteristics of Fibril Gels: The Case of beta-Lactoglobulin and alpha-Lactalbumin." Journal of Food Science **74**(3): R47-R55.
- Lund, M. and B. Jönsson (2005). "On the Charge Regulation of Proteins." Biochemistry **44**(15): 5722-5727.

M

- MacPhee, C. E. and C. M. Dobson (2000). "Formation of mixed fibrils demonstrates the generic nature and potential utility of amyloid nanostructures." Journal of the American Chemical Society **122**(51): 12707-12713.
- Man, P., C. Montagner, et al. (2007). "Defining the interacting regions between apomyoglobin and lipid membrane by hydrogen/deuterium exchange coupled to mass spectrometry." Journal of Molecular Biology **368**(2): 464-472.
- Maresov, E. A. and A. N. Semenov (2008). "Mesoglobule Morphologies of Amphiphilic Polymers." Macromolecules **41**(23): 9439-9457.
- Matsumoto, H., Y. Shimokawa, et al. (2001). "New Biological Function of Bovine α -Lactalbumin: Protective Effect against Ethanol- and Stress-induced Gastric Mucosal Injury in Rats." Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry **65**(5): 1104-1111.

- Maugey, J., T. Van Nuland, et al. (2001). "Small angle light scattering investigation of polymerisation induced phase separation mechanisms." *Polymer* **42**(9): 4353-4366.
- McKenna, S., J. Hu, et al. (2003). "Energetics and specificity of interactions within Ub center dot Uev center dot Ubc13 human ubiquitin conjugation complexes." *Biochemistry* **42**(26): 7922-7930.
- McKenna, S., T. Moraes, et al. (2003). "An NMR-based model of the ubiquitin-bound human ubiquitin conjugation complex Mms2 center dot Ubc13 - The structural basis for lysine 63 chain catalysis." *Journal of Biological Chemistry* **278**(15): 13151-13158.
- McKenna, S., L. Spyropoulos, et al. (2001). "Noncovalent interaction between ubiquitin and the human DNA repair protein mms2 is required for ubc13-mediated polyubiquitination." *Journal of Biological Chemistry* **276**(43): 40120-40126.
- Mertens, H. D. T. and D. I. Svergun (2010). "Structural characterization of proteins and complexes using small-angle X-ray solution scattering." *Journal of Structural Biology* **172**(1): 128-141.
- Meyer, Bernd, et al. (2003). "NMR spectroscopy techniques for screening and identifying ligand binding to protein receptors." *NMR Spectroscopy of Proteins* **42**(8): 27.
- Mitraki, A. and J. King (1989). "Protein folding intermediates and inclusion body formation " *Bio-Technology* **7**(7): 690-697.
- Morozova, L. A., D. T. Haynie, et al. (1995). "Structural basis of the stability of a lysozyme molten globule." *Nature Structural Biology* **2**(10): 871-875.
- Morton, C. J., D. J. R. Pugh, et al. (1996). "Solution structure and peptide binding of the SH3 domain from human Fyn." *Structure* **4**(6): 705-714.
- Mossa, S., F. Sciortino, et al. (2004). "Ground-state clusters for short-range attractive and long-range repulsive potentials." *Langmuir* **20**(24): 10756-10763.
- Mossberg, A.-K., K. Hun Mok, et al. (2010). "Structure and function of human α -lactalbumin made lethal to tumor cells (HAMLET)-type complexes." *FEBS Journal* **277**(22): 4614-4625.
- Murphy, R. M. (1997). "Static and dynamic light scattering of biological macromolecules: What can we learn?" *Current Opinion in Biotechnology* **8**(1): 25-30.

N

- Namba, K. and G. Stubbs (1986). "Structure of Tobacco Mosaic Virus at 3.6Å resolution : implications for assembly " *Science* **231**(4744): 1401-1406.
- Nigen, M. (2009). Interactions et assemblages entre l'alpha lactalbumine et le lysozyme: mécanismes, structures et stabilité.
- Nigen, M., T. Croguennec, et al. (2009). "Formation and stability of alpha-lactalbumin-lysozyme spherical particles: Involvement of electrostatic forces." *Food Hydrocolloids* **23**(2): 510-518.
- Nigen, M., T. Croguennec, et al. (2007). "Apo alpha-lactalbumin and lysozyme are colocalized in their subsequently formed spherical supramolecular assembly." *Febs Journal* **274**: 6085-6093.
- Nigen, M., T. Croguennec, et al. (2007). "Temperature affects the supramolecular structures resulting from alpha-lactalbumin-lysozyme interaction." *Biochemistry* **46**(5): 1248-1255.
- Nigen, M., C. Gaillard, et al. (2010). "Dynamic and supramolecular organisation of alpha-lactalbumin/lysozyme microspheres: A microscopic study." *Biophysical Chemistry* **146**(1): 30-35.
- Nigen, M., V. Le Tilly, et al. (2009). "Molecular interaction between apo or holo alpha-lactalbumin and lysozyme: Formation of heterodimers as assessed by fluorescence

- measurements." Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics **1794**(4): 709-715.
- Nilsson, M. R. (2004). "Techniques to study amyloid fibril formation in vitro." Methods **34**(1): 151-160.
- Nobbmann, U., M. Connah, et al. (2007). "Dynamic light scattering as a relative tool for assessing the molecular integrity and stability of monoclonal antibodies." Biotechnol Genet Eng Rev **24**: 117-128.
- Nooren, I. M. A. and J. M. Thornton (2003). "Structural characterisation and functional significance of transient protein-protein interactions." Journal of Molecular Biology **325**: 991-1018.

O-P

- Oltersdorf, T., S. W. Elmore, et al. (2005). "An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours." Nature **435**(7042): 677-681.
- Ou, Z. Y. and M. Muthukumar (2006). "Entropy and enthalpy of polyelectrolyte complexation: Langevin dynamics simulations." Journal of Chemical Physics **124**(15).
- Pan, X., S. Yu, et al. (2007). "Self-assembly of [beta]-casein and lysozyme." Journal of Colloid and Interface Science **316**(2): 405-412.
- Parker, M. J. and A. R. Clarke (1997). "Amide backbone and water-related H/D isotope effects on the dynamics of a protein folding reaction." Biochemistry **36**(19): 5786-5794.
- Perez-Jimenez, R., R. Godoy-Ruiz, et al. (2004). "The Efficiency of Different Salts to Screen Charge Interactions in Proteins: A Hofmeister Effect?" Biophysical Journal **86**(4): 2414-2429.
- Persson, B. A., B. Jonsson, et al. (2009). "Enhanced Protein Steering: Cooperative Electrostatic and van der Waals Forces in Antigen-Antibody Complexes." Journal of Physical Chemistry B **113**(30): 10459-10464.
- Persson, B. A. and M. Lund (2009). "Association and electrostatic steering of alpha-lactalbumin-lysozyme heterodimers." Physical Chemistry Chemical Physics **11**(39): 8879-8885.
- Pfuhl, M., H. A. Chen, et al. (1999). "NMR exchange broadening arising from specific low affinity protein self-association: Analysis of nitrogen-15 nuclear relaxation for rat CD2 domain 1." Journal of Biomolecular Nmr **14**(4): 307-320.
- Phillips, D. C. (1967). "Hen egg-white lysozyme molecule " Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **57**(3): 484-&.
- Pike, A. C. W., K. Brew, et al. (1996). "Crystal structures of guinea-pig, goat and bovine alpha-lactalbumin highlight the enhanced conformational flexibility of regions that are significant for its action in lactose synthase." Structure **4**(6): 691-703.
- Plakoutsi, G., F. Bemporad, et al. (2005). "Evidence for a mechanism of amyloid formation involving molecular reorganisation within native-like precursor aggregates." Journal of Molecular Biology **351**(4): 910-922.
- Plaxco, K. W. and C. M. Dobson (1996). "Time-resolved biophysical methods in the study of protein folding." Current Opinion in Structural Biology **6**(5): 630-636.
- Polverino de Laureto, P., E. Frare, et al. (2005). "Protein dissection enhances the amyloidogenic properties of α -lactalbumin." FEBS Journal **272**(9): 2176-2188.
- Poznanski, J., Y. Georgalis, et al. (2003). "Comparison of two different lysozyme types under native and crystallization conditions using two-dimensional NMR and dynamic light scattering." Biophysical Chemistry **104**(3): 605-616.
- Price, W. S. (2006). "Protein association studied by NMR diffusometry." Current Opinion in Colloid & Interface Science **11**(1): 19-23.

- Ptitsyn, O. B. and A. A. Rashin (1973). "Self-organization of myoglobin molecule " Doklady Akademii Nauk Sssr **213**(2): 473-475.
- Pursglove, S. E., T. D. Mulhern, et al. (2002). "The solution structure and intramolecular associations of the Tec kinase Src homology 3 domain." Journal of Biological Chemistry **277**(1): 755-762.

Q-R

- Qasba, P. K. and S. Kumar (1997). "Molecular divergence of lysozymes and alpha-lactalbumin." Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology **32**(4): 255-306.
- Radford, S. E. (2000). "Protein folding: progress made and promises ahead." Trends in Biochemical Sciences **25**(12): 611-618.
- Radford, S. E., M. Buck, et al. (1992). "Hydrogen-exchange in native and denatured states of hen-egg white lysozyme " Proteins-Structure Function and Genetics **14**(2): 237-248.
- Radford, S. E. and C. M. Dobson (1995). "Insights into protein-folding using physical techniques - studies of lysozyme and alpha-lactalbumin " Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences **348**(1323): 17-25.
- Radford, S. E., C. M. Dobson, et al. (1992). "The folding of hen lysozyme involves partially structured intermediates and multiple pathways." Nature **358**(6384): 302-307.
- Rammensee, S., D. Huemmerich, et al. (2006). "Rheological characterization of hydrogels formed by recombinantly produced spider silk." Applied Physics A: Materials Science & Processing **82**(2): 261-264.
- Raviv, U., D. J. Needleman, et al. (2005). "Cationic liposome-microtubule complexes: Pathways to the formation of two-state lipid-protein nanotubes with open or closed ends." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **102**(32): 11167-11172.
- Redfield, C. and C. M. Dobson (1988). "Sequential H¹-NMR assignments and secondary structure of hen egg-white lysozyme in solution." Biochemistry **27**(1): 122-136.
- Riek, R., K. Pervushin, et al. (2000). "TROSY and CRINEPT: NMR with large molecular and supramolecular structures in solution." Trends in Biochemical Sciences **25**(10): 462-468.
- Roberts, G. C. K. (2003). The Determination of Equilibrium Dissociation Constants of Protein-Ligand Complexes by NMR, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Rule, G. and T. Hitchens (2006). Fundamentals of protein NMR spectroscopy, Springer.

S

- Sagis, L. M. C., C. Veerman, et al. (2002). "Mesoscopic structure and viscoelastic properties of [beta]-lactoglobulin gels at low pH and low ionic strength." Food Hydrocolloids **16**(3): 207-213.
- Sagis, L. M. C., C. Veerman, et al. (2004). "Mesoscopic properties of semiflexible amyloid fibrils." Langmuir **20**(3): 924-927.
- Sanguansri, P. and M. A. Augustin (2006). "Nanoscale materials development - a food industry perspective." Trends in Food Science & Technology **17**(10): 547-556.
- Schanda, P. and B. Brutscher (2005). "Very fast two-dimensional NMR spectroscopy for real-time investigation of dynamic events in proteins on the time scale of seconds." Journal of the American Chemical Society **127**(22): 8014-8015.
- Scheibel, T., R. Parthasarathy, et al. (2003). "Conducting nanowires built by controlled self-assembly of amyloid fibers and selective metal deposition." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100**(8): 4527-4532.

- Scheiner, S. and M. Cuma (1996). "Relative stability of hydrogen and deuterium bonds." Journal of the American Chemical Society **118**(6): 1511-1521.
- Schlörb, C., K. Ackermann, et al. (2005). "Heterologous expression of hen egg white lysozyme and resonance assignment of tryptophan side chains in its non-native states." Journal of Biomolecular Nmr **33**(2): 95-104.
- Schmitt, C., C. Sanchez, et al. (2001). "Study of beta-lactoglobulin/acacia gum complex coacervation by diffusing-wave spectroscopy and confocal scanning laser microscopy." Colloids and Surfaces B-Biointerfaces **20**(3): 267-280.
- Schreiber, G. and A. R. Fersht (1996). "Rapid, electrostatically assisted association of proteins." Nature Structural Biology **3**(5): 427-431.
- Schueler-Furman, O., C. Wang, et al. (2005). "Progress on modeling of protein structures and interactions." Science **310**(5748): 638-642.
- Schumann, F., H. Riepl, et al. (2007). "Combined chemical shift changes and amino acid specific chemical shift mapping of protein-protein interactions." Journal of Biomolecular Nmr **39**(4): 275-289.
- Sheinerman, F. B., R. Norel, et al. (2000). "Electrostatic aspects of protein-protein interactions." Current Opinion in Structural Biology **10**(2): 153-159.
- Shih, P., D. R. Holland, et al. (1995). "Thermal stability determinants of chicken egg-white lysozyme core mutants: hydrophobicity, packing volume, and conserved buried water-molecules." Protein Science **4**(10): 2050-2062.
- Shuker, S. B., P. J. Hajduk, et al. (1996). "Discovering high-affinity ligands for proteins: SAR by NMR." Science **274**(5292): 1531-1534.
- Sinha, N. and S. J. Smith-Gill (2002). "Electrostatics in protein binding and function." Current Protein & Peptide Science **3**(6): 601-614.
- Slotta, U. K., S. Rammensee, et al. (2008). "An engineered spider silk protein forms microspheres." Angewandte Chemie-International Edition **47**(24): 4592-4594.
- Spaar, A., C. Dammer, et al. (2006). "Diffusional encounter of barnase and barstar." Biophysical Journal **90**: 1913-1924.
- Speed, M. A., J. King, et al. (1997). "Polymerization mechanism of polypeptide chain aggregation." Biotechnology and Bioengineering **54**(4): 333-343.
- Spiess, K., A. Lammel, et al. (2010). "Recombinant Spider Silk Proteins for Applications in Biomaterials." Macromolecular Bioscience **10**(9): 998-1007.
- Stevens, L. (1991). "Egg-white proteins " Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology **100**(1): 1-9.
- Stuart, D. I., K. R. Acharya, et al. (1986). "Alpha-lactalbumin possesses a novel calcium-binding loop." Nature **324**(6092): 84-87.
- Surewicz, W. K., H. H. Mantsch, et al. (1993). "Determination of protein secondary structure by Fourier-Transform Infrared Spectroscopy: a critical assessment " Biochemistry **32**(2): 389-394.
- Svensson, M., H. Sabharwal, et al. (1999). "Molecular Characterization of α -Lactalbumin Folding Variants That Induce Apoptosis in Tumor Cells." Journal of Biological Chemistry **274**(10): 6388-6396.

T-U

- Takeuchi, K. and G. Wagner (2006). "NMR studies of protein interactions." Current Opinion in Structural Biology **16**(1): 109-117.
- Tan, R. C., T. N. Truong, et al. (1993). "Acetylcholinesterase - electrostatic steering increases the rate of ligand-binding " Biochemistry **32**(2): 401-403.
- Tanford, C. (1968). "Protein denaturation." Adv Protein Chem **23**: 121-282.

- Tani, F., M. Murata, et al. (1993). "Heat-induced transparent gel from hen egg lysozyme by a 2-step heating method " Bioscience Biotechnology and Biochemistry **57**(2): 209-214.
- Trexler, A. J. and M. R. Nilsson (2007). "The formation of amyloid fibrils from proteins in the lysozyme family." Current Protein & Peptide Science **8**(6): 537-557.
- Troullier, A., D. Reinstadler, et al. (2000). "Transient non-native secondary structures during the refolding of alpha-lactalbumin detected by infrared spectroscopy." Nature Structural Biology **7**(1): 78-86.
- Turgeon, S. L., M. Beaulieu, et al. (2003). "Protein-polysaccharide interactions: phase-ordering kinetics, thermodynamic and structural aspects." Current Opinion in Colloid & Interface Science **8**(4-5): 401-414.
- Turgeon, S. L., C. Schmitt, et al. (2007). "Protein-polysaccharide complexes and coacervates." Current Opinion in Colloid & Interface Science **12**(4-5): 166-178.
- Ushida, Y., Y. Shimokawa, et al. (2003). "Effects of Bovine α -Lactalbumin on Gastric Defense Mechanisms in Naive Rats." Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry **67**(3): 577-583.
- Uversky, V. N. and A. L. Fink (2004). "Conformational constraints for amyloid fibrillation: the importance of being unfolded." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics **1698**(2): 131-153.

V

- van den Berg, B., E. W. Chung, et al. (1999). "Characterisation of the dominant oxidative folding intermediate of hen lysozyme." Journal of Molecular Biology **290**(3): 781-796.
- van der Linden, E. and P. Venema (2007). "Self-assembly and aggregation of proteins." Current Opinion in Colloid & Interface Science **12**(4-5): 158-165.
- van Dijk, A. D. J., R. Kaptein, et al. (2006). "Combining NMR relaxation with chemical shift perturbation data to drive protein-protein docking." Journal of Biomolecular Nmr **34**(4): 237-244.
- Van Nuland, N. A. J., V. Forge, et al. (1998). "Real-time NMR studies of protein folding." Accounts of Chemical Research **31**(11): 773-780.
- Van Nuland, N. A. J., G. J. A. Kroon, et al. (1993). "The NMR determination of the IIA-mtl binding site on HPr of the Escherichia coli phosphoenol pyruvate-dependent phosphotransferase system." FEBS Letters **315**(1): 11-15.
- Vaynberg, J. and J. Qin (2006). "Weak protein-protein interactions as probed by NMR spectroscopy." Trends in Biotechnology **24**(1): 22-27.
- Veerman, C., H. Baptist, et al. (2003). "A new multistep Ca^{2+} -Induced cold gelation process for beta-lactoglobulin." Journal of Agricultural and Food Chemistry **51**(13): 3880-3885.
- Veerman, C., G. de Schiffart, et al. (2003). "Irreversible self-assembly of ovalbumin into fibrils and the resulting network rheology." International Journal of Biological Macromolecules **33**(1-3): 121-127.
- Veerman, C., L. M. C. Sagis, et al. (2003). "Mesostructure of fibrillar bovine serum albumin gels." International Journal of Biological Macromolecules **31**(4-5): 139-146.
- Villari, V. and N. Micali (2008). "Light scattering as spectroscopic tool for the study of disperse systems useful in pharmaceutical sciences." Journal of Pharmaceutical Sciences **97**(5): 1703-1730.
- Viney, C. (2004). "Self-assembly as a route to fibrous materials: concepts, opportunities and challenges." Current Opinion in Solid State & Materials Science **8**(2): 95-101.
- Voisine, C., J. S. Pedersen, et al. (2010). "Chaperone networks: Tipping the balance in protein folding diseases." Neurobiology of Disease **40**(1): 12-20.

Vrettos, J. S. and C. W. Meuse (2009). "Infrared techniques for quantifying protein structural stability." Analytical Biochemistry **390**(1): 14-20.

W

Wade, R. C., R. R. Gabdoulhine, et al. (1998). "Electrostatic steering and ionic tethering in enzyme-ligand binding: Insights from simulations." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **95**(11): 5942-5949.

Wang, J., M. Dauter, et al. (2007). "Triclinic lysozyme at 0.65 Å resolution." Acta Crystallographica Section D **63**(12): 1254-1268.

Wetzel, R. (1996). "For protein misassembly, it's the 'I' decade." Cell **86**(5): 699-702.

Wijesinha-Bettoni, R., C. M. Dobson, et al. (2001). "Comparison of the structural and dynamical properties of holo and apo bovine alpha-lactalbumin by NMR spectroscopy." Journal of Molecular Biology **307**(3): 885-898.

Y

Yan, C. Q. and D. J. Pochan (2010). "Rheological properties of peptide-based hydrogels for biomedical and other applications." Chemical Society Reviews **39**(9): 3528-3540.

Yan, H., H. Frielinghaus, et al. (2008). "Thermoreversible lysozyme hydrogels: properties and an insight into the gelation pathway." Soft Matter **4**(6): 1313-1325.

Yan, H., A. Saiani, et al. (2006). "Thermoreversible protein hydrogel as cell scaffold." Biomacromolecules **7**(10): 2776-2782.

Yu, S. Y., P. Yao, et al. (2006). "Nanogels prepared by self-assembly of oppositely charged globular proteins." Biopolymers **83**(2): 148-158.

Z

Zandomenighi, G., M. R. H. Krebs, et al. (2004). "FTIR reveals structural differences between native β -sheet proteins and amyloid fibrils." Protein Science **13**(12): 3314-3321.

Zhang, C. and S. H. Kim (2000). "A comprehensive analysis of the Greek key motifs in protein beta-barrels and beta-sandwiches." Proteins-Structure Function and Genetics **40**(3): 409-419.

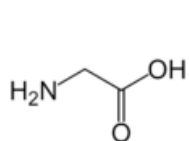
Zhang, S., D. M. Marini, et al. (2002). "Design of nanostructured biological materials through self-assembly of peptides and proteins." Current Opinion in Chemical Biology **6**(6): 865-871.

Zhang, S. G. (2003). "Fabrication of novel biomaterials through molecular self-assembly." Nature Biotechnology **21**(10): 1171-1178.

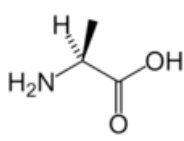
Zhang, Y. and P. S. Cremer (2006). "Interactions between macromolecules and ions: the Hofmeister series." Current Opinion in Chemical Biology **10**(6): 658-663.

Zuiderweg, E. R. P. (2002). "Mapping protein-protein interactions in solution by NMR Spectroscopy." Biochemistry **41**(1): 1-7.

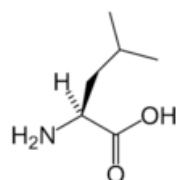
Aliphatiques Hydrophobes



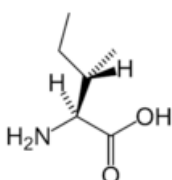
Glycine (Gly / G)



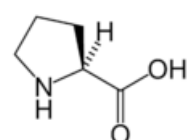
Alanine (Ala / A)



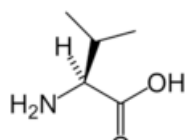
Leucine (Leu / L)



Isoleucine (Ile / I)

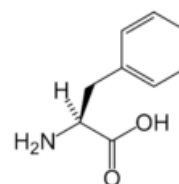


Proline (Pro / P)

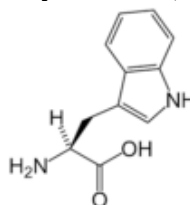


Valine (Val / V)

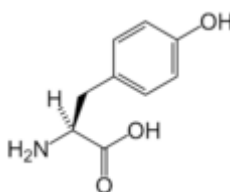
Aromatiques Hydrophobes



Phénylalanine (Phe / F)



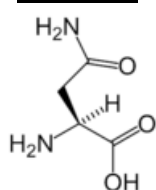
Tryptophane (Trp / W)



Tyrosine (Tyr / Y)

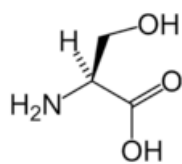
Polaires

Amidés

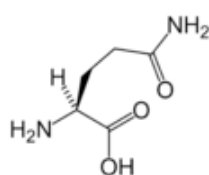


Asparagine (Asn / N)

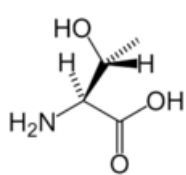
Hydroxylés



Sérine (Ser / S)

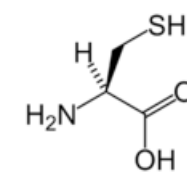


Glutamine (Gln / Q)

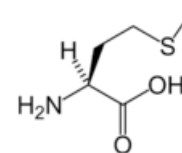


Thréonine (Thr / T)

Soufrés

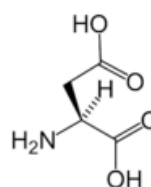


Cystéine (Cys / C)

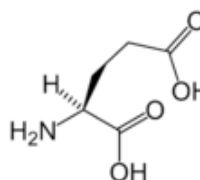


Méthionine (Met / M)

Diacides

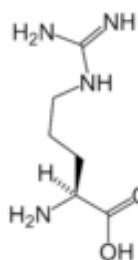


Acide aspartique (Asp / D)

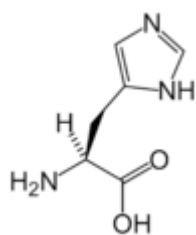


Acide glutamique (Glu / E)

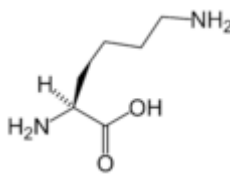
Dibasiques



Arginine (Arg / R)



Histidine (His / H)



Lysine (Lys / K)

Holo α -lactalbumine

	¹ H (ppm)	¹⁵ N (ppm)		¹ H (ppm)	¹⁵ N (ppm)
Q2	8.34639	121.62157	C61	7.97142	112.37099
L3	8.23742	123.87572	K62	8.15066	122.7672
T4	7.89747	109.12158	D63	8.42495	128.28154
K5	8.73204	120.23456	D64	8.09207	114.98386
C6	8.43035	113.26173	Q65	7.91264	119.07816
E7	7.66667	121.84207	N66	7.96061	114.23843
V8	8.07286	120.92268	H68	7.55243	116.19286
F9	7.91846	118.15302	S70	8.00102	121.87275
R10	7.16623	114.91441	N71	7.95318	117.16856
E11	8.47649	117.11124	I72	8.73081	120.23254
L12	7.81774	117.55089	C73	9.46984	113.50245
K13	6.87202	119.06535	I75	9.19285	121.15294
D14	9.15891	119.29662	S76	7.64686	120.00901
K16	7.60981	122.09055	C77	8.36395	123.45329
G17*	8.60891	118.15302	D78	8.07913	115.36045
Y18	8.21561	127.1366	K79	7.5142	120.58721
G19	8.81545	118.38431	F80	8.0967	121.72542
G20	7.95077	104.96255	D82	7.43392	118.37858
V21	7.02672	122.77798	D83	7.89575	113.75294
S22	8.15064	122.76517	D84	7.34475	117.89679
L23	9.44349	119.97832	L85	9.44995	129.13789
W26	8.10674	123.58781	T86	8.43837	114.91508
V27	8.75021	123.69805	D87	8.01061	120.43516
C28	7.56796	120.69645	D88	10.35403	125.32275
T30	8.64747	113.57324	V90	7.4538	120.45235
F31	7.57638	125.32275	C91	7.6368	117.67765
H32	7.43753	116.97167	V92	8.47524	121.7942
T33	7.82655	115.60825	K93	7.81037	116.92312
S34	8.00308	110.7392	K94	7.13327	118.15875
G35	7.91988	116.0715	I95	8.00124	121.86297
Y36	7.04612	106.13987	L96	9.02152	121.85926
D37	7.1187	119.06535	D97	8.43422	118.59064
T38	7.73283	115.38338	K98	7.91789	118.15302
E39	8.09679	114.76404	V99	8.88842	115.3709
A40	6.84623	122.78439	G100	8.14245	109.88151
I41	7.92692	121.17115	Y103	7.49781	120.24603
V42	8.42495	128.27582	W104	8.16987	117.6896
Q43	8.62136	127.07355	A106	8.64308	116.52731
N44	8.70852	124.39088	H107	7.55243	116.19286
S47	7.73399	113.5274	L110	7.69548	114.22124
T48	8.47128	119.28448	C111	7.37147	117.21509
E49	8.79413	125.14879	S112	7.93714	111.20177
G51	9.42641	112.12824	E113	7.67064	118.49894
L52	10.00871	123.76683	Q117	7.91988	116.0715
F53	8.67869	109.34713	W118	7.78206	121.38524
Q54	8.0053	117.06539	L119	6.89524	115.59005
I55	8.13682	124.18927	C120	6.87146	119.05927
N56	7.38774	125.79678	K122	7.97065	121.14822
K58	8.76112	119.76627	L123	7.65967	129.74576
W60	6.48507	118.35935			

Lysozyme

	¹ H (ppm)	¹⁵ N (ppm)			¹ H (ppm)	¹⁵ N (ppm)
G4	8.34237	105.09048		N65	8.22743	118.1441
L8	8.48839	120.83892		G67	8.27238	108.8924
A9	8.28904	121.35288		R68	8.00593	117.41685
A11	7.66882	121.99403		S72	7.21824	112.02028
M12	8.85101	116.64548		R73	8.01391	124.37001
K13	8.36272	120.99337		N74	8.10066	115.46398
G16	7.61222	106.34813		L75	8.94173	118.59187
L17	7.16264	115.36967		C76	9.43397	113.29047
D18	8.58848	117.93947		I78	8.66291	116.86655
N19	8.41702	123.82274		C80	8.17877	123.30618
Y20	8.09215	125.924		A82	7.54392	125.0752
R21	8.87644	126.14465		L83	7.76723	114.87648
G22	7.54905	101.97861		L84	7.02213	118.90033
Y23	7.60237	119.4662		D87	8.14517	120.49282
S24	8.87408	121.54324		I88	7.95311	118.18779
L25	8.87341	121.55059		T89	8.17956	119.70068
G26	9.49072	104.8175		A90	9.10233	121.9763
N27	8.14595	117.14516		S91	7.61135	115.25848
W28	7.10889	120.47119		V92	8.3054	120.96525
V29	7.51425	118.44477		N93	8.52066	118.23235
C30	7.95299	118.19514		C94	7.80919	117.37143
A31	8.01391	119.46533		A95	8.71086	123.44895
A32	7.42064	116.7558		K96	8.01591	115.07159
F34	7.3495	114.88383		K97	7.20491	121.34985
E35	8.68809	119.20836		I98	7.94337	121.28799
S36	7.78498	108.15823		V99	8.25609	116.72984
N37	8.05492	126.42585		S100	7.65062	116.0264
F38	7.37895	105.47812		D101	7.975	120.28256
Q41	7.93344	116.14667		N103	8.03998	118.18174
A42	6.80051	122.80607		G104	8.15483	107.64558
T43	8.24361	115.36102		N106	7.57074	114.56715
N44	8.14449	120.49326		A107	6.78251	119.2209
R45	8.65908	126.6101		V109	9.01483	129.28247
N46	8.81598	123.20279		A110	7.95189	118.18736
D48	7.82611	118.66541		W111	7.31749	115.61194
G49	7.82611	107.91596		R112	8.45082	121.243
S50	8.19113	116.15402		N113	7.91595	113.28225
T51	9.10581	118.21721		R114	7.78739	114.4339
D52	8.71753	125.61121		C115	7.32905	113.79059
Y53	8.92948	118.58451		K116	7.03856	124.06977
G54	9.05041	111.2567		T118	7.60679	110.20975
I55	9.22078	120.95616		D119	8.52077	118.23409
L56	8.86453	119.40694		V120	7.91442	121.79632
Q57	7.92029	114.84706		Q121	8.36328	120.99727
I58	7.58876	120.75024		A122	7.64531	122.03643
N59	8.51176	127.46112		I124	7.49474	108.69036
S60	9.11345	119.72231		R125	7.27486	125.39404
R61	8.70247	123.2759		C127	7.41713	116.3885
W62	7.04247	115.0677		I129	7.80746	131.0251
W63	7.40007	114.53903				

Le développement de biomatériaux utilisant les propriétés d'auto-assemblage des protéines est au cœur de nombreuses recherches car les objets supramoléculaires résultants présentent un large potentiel applicatif pour les industries agroalimentaire, pharmaceutique et biotechnologique. La compréhension des forces gouvernant l'assemblage des protéines est essentielle pour contrôler la stabilité, la morphologie et les fonctionnalités des objets formés. Cette étude s'intéresse au système binaire composé de protéines de charges opposées : le lysozyme (LYS) et l' α -lactalbumine (LAC). Le lysozyme interagit avec les formes calcifiées (holo) et décalcifiées (apo) de l' α -lactalbumine pour former des hétérodimères. Seuls les hétérodimères apoLAC-LYS s'assemblent en objets supramoléculaires dont la morphologie dépend de la température. Lorsque l'apoLAC est dans sa conformation native ($T < 26^\circ\text{C}$), des agrégats amorphes sont obtenus, alors que des objets sphériques ordonnés, appelés microsphères, sont obtenus lorsqu'elle adopte un état conformationnel particulièrement flexible, appelé « molten globule » (45°C). Pour comprendre comment l'information contenue à l'échelle moléculaire se propage à l'échelle microscopique, les objectifs de ma thèse étaient de caractériser les interactions impliquées à l'échelle moléculaire et d'établir le mécanisme d'assemblage. L'identification des acides aminés impliqués dans l'interface des hétérodimères a mis en évidence une orientation particulière des protéines gouvernée par des attractions électrostatiques et la formation de tétramères par associations des dimères apoLAC-LYS. La croissance de particules sub-micrométriques, à partir des nucléi formés par agrégation des tétramères, est indépendante de la température et est gouvernée par collision et fusion de particules plus petites. C'est au stade final du mécanisme, que l'état conformationnel de l'apoLAC joue un rôle important. En effet, la coalescence des particules et la réorganisation des protéines en microsphères sont favorisées par la flexibilité du « molten globule » et impliquent probablement des associations hydrophobes. Enfin, la formation de microsphères n'implique pas de changements importants de structure secondaire des protéines assemblées, ce qui explique la réversibilité des objets formés et le dynamisme des protéines assemblées. L'approche mise en œuvre pour réaliser ce travail peut être utilisée pour étudier l'assemblage d'autres systèmes protéiques binaires et les éléments fondamentaux apportés permettent d'envisager des applications potentielles des microsphères.

Mots clé : α -lactalbumine, lysozyme, surface d'interaction, assemblage protéique, objets supramoléculaires

Many researches focus on the design of biomaterials using the self-assembly properties of proteins since the resulting supramolecular objects exhibit many potential applications for food, pharmaceutical and biotechnology industries. The understanding of the driving forces governing protein assembly is a prerequisite to control the stability, morphology and functionalities of the resulting objects. This study focuses on the binary system composed of oppositely charged proteins: the lysozyme (LYS) and the α -lactalbumine (LAC). LYS interacts with calcium-loaded (holo) and calcium-depleted (apo) forms of LAC to form heterodimers. Only the apoLAC-LYS dimers further assemble into supramolecular objects with morphologies depending on the temperature. When apoLAC is in a native conformation, the assembly results in amorphous aggregates, whereas ordered spherical objects, called microspheres, are obtained when it adopts a conformational state with a particular flexibility, called "molten globule". In order to understand how the information contained at molecular scale are spread on microscopic scale, my PhD thesis objectives were to characterize the interactions involved at molecular level and to establish the assembly mechanism. The identification of the residues composing the heterodimers interfaces evidenced a preferential orientation of proteins resulting from electrostatic attractions, and the formation of tetramers by association of the apoLAC-LYS dimers. Sub-micrometric particles growth, from the nuclei formed by the aggregation of tetramers, is independent of the temperature and governed by collision and fusion of smaller particles. At the final stage of the mechanism, the conformational state of apoLAC plays an important role. The coalescence of particles and reorganisation of proteins into microspheres is favoured by the flexibility of the molten globule and probably involve hydrophobic interactions. Finally, the microspheres formation does not involved drastic secondary structure changes of assembled proteins, which explains the reversibility of the objects and the dynamic behaviour of assembled proteins. The experimental strategy adopted to perform this work can be translated to study the assembly of other protein binary systems and the obtained fundamental elements can be used to envisage potential applications of the microspheres.

Key words: α -lactalbumine, lysozyme, interaction surface, protein assembly, supramolecular objects